ZUR ANALYTIK ATRIALER NATRIURETISCHER PEPTIDE

Anita Friedrich

Disbui. München
1989

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0065

Aus dem
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

ZUR ANALYTIK

ATRIALER NATRIURETISCHER PEPTIDE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Anita Friedrich

aus

München

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr. habil. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

INHALTSVERZEICHNIS Seite

Liste der verwendeten Abkürzungen

1. EINLEITUNG 1

2. PROBLEMSTELLUNG 6

3. MATERIALIEN 8

3.1. Tiere 8

3.2. Geräte 8

3.3. Substanzen 10
3.3.1. Atriale Natriuretische Peptide 10
3.3.2. Radioaktiv markierte Substanzen 11
3.3.3. Antikörper 11
3.3.4. andere Substanzen 11

4. METHODEN 12

4.1. Organgewinnung 12

4.2. Extraktionen 12
4.2.1. HCl-Extraktion 12
4.2.2. Essigsäure-Extraktion 13
4.2.3. HCl-Aceton-Extraktion 13
4.2.4. HCl-Heptan-Extraktion 13
4.2.5. Organextraktion in Gegenwart von Enzymhemmmern 14
4.2.6. Organextraktion in Gegenwart von SDS, Triton X-100, Harnstoff oder NaCl 14
4.2.7. Wiederfindungsversuche 14

4.3. Vorreinigung 15
4.3.1. C_{18}-Cartridges 15
4.3.2. XAD-4 16
4.3.3. SP-Sephadex C-25 17
4.3.4. Ultrafiltration 17

4.4. Antiserumgewinnung 18
4.4.1. Kopplung von rat ANF(99-126) an Thyreoglobulin 18
4.4.2. Herstellung einer Emulsion mit Freundschem Adjuvans, Immunisierung 18

4.5. Titerbestimmung 19

4.6. RIA-Techniken 19

4.7. Antiserumcharakterisierung 23

4.8. Proteinbestimmung 26

4.9. Gelchromatographie 26

4.10. HPLC 28

4.11. in vitro-Metabolisierung von ANF(1-126) 31

4.12. Biologische Bestimmung vom ANF-Peptiden 31

5. ERGEBNISSE 33

5.1. Bindungsepitope der verwendeten Antiseren 33

5.2 Vorversuche 36
5.2.1. Extraktion 36
5.2.2. Vorreinigung 37

5.3. Versuche mit Atrien 38
5.3.1. Rattenatrien 38
5.3.1.1. Extraktion 39
5.3.1.2. Gelchromatographie 41
5.3.1.3. HPLC 42
5.3.1.4. in vitro-Metabolisierung von ANF(1-126) 44
5.3.1.5. Quantifizierung 47
5.3.1.6. biologische Aktivität von ANF-Peptiden 47
5.3.2. Atrien anderer Tierspezies 49

5.4. weitere Organe 51
5.4.1. Lunge 51
5.4.2. Gehirn 53
5.4.3. Speicheldrüsen 56
5.4.4. Pankreas 58
5.4.5. Gastrointestinaltrakt 60
5.4.6. Milz 75
5.4.7. Testes 77

6. DISKUSSION 81

7. ZUSAMMENFASSUNG 96

8. SUMMARY 98

9. LITERATURVERZEICHNIS 100

Lebenslauf

Liste der verwendeten Abkürzungen

ADH	: Antidiuretisches Hormon
ANF	: Atrialer Natriuretischer Faktor
BSA	: Rinderserumalbumin
c-GMP	: cyclisches Guanosinmonophosphat
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
HHL	: Hypophysenhinterlappen
HPLC	: Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HP-GFC	: Hochdruckgelfiltrationschromatographie
IR	: Immunreaktion
MG	: Molekulargewicht
PBS	: Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung
PEG	: Polyethylenglycol
PMSF	: Phenylmethylsulfonylfluorid
RIA	: Radioimmunoassay
RP-HPLC	: Umkehrphasen-HPLC
SDS	: Natriumdodecylsulfat
TFA	: Trifluoressigsäure

1. EINLEITUNG

Im Jahre 1956 berichtete der Morphologe Kisch (1) erstmals über sogenannte "elektronendichte Körperchen" in Herzvorhofmuskelzellen des Meerschweinchens. Sie traten vorwiegend perinukleär auf und waren mit einem voluminösen Golgi-Apparat assoziiert (2). In der Folgezeit konnten derartige Strukturen in den atrialen Kardiozyten verschiedener Säugetierspezies, einschließlich des Menschen, nachgewiesen werden (3). Die Arbeitsgruppe von Cantin erkannte Mitte der 70er Jahre die Ähnlichkeit der beschriebenen Strukturen mit hormonspeichernden Granula endokriner Zellen (4) und demonstrierte mittels ultrastruktureller Untersuchungen die Proteinnatur dieser Granula (5,6). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß radioaktiv markierte Aminosäuren in die Granula inkorporiert wurden (7). Etwa gleichzeitig fanden Mairie et al. (8), daß die Quantität der atrialen Granula sich abhängig von der Elektrolyt- und Wasseraufnahme der Versuchstiere änderte. Die Zufuhr hoher Salzkonzentrationen bewirkte eine Degranulation der Atrien, während bei vermindertem Angebot von Wasser und Salzen die Anzahl der Granula zunahm. Dieser offensichtliche Zusammenhang ließ de Bold et al. vermuten, daß die Granula eine Substanz speichern, die eine Bedeutung bei der Homöostase des Wasser- und Salzhaushalts besitzt (9). Tatsächlich beobachteten sie nach intravenöser Injektion eines Vorhofextrakts in Ratten eine Senkung des arteriellen Blutdrucks, verbunden mit einer starken Diurese und Natriurese (10). Das diese

Wirkungen auslösende Prinzip benannten sie "Atrial Natriuretic Factor" (4).

Die Entdeckung eines natriuretisch wirksamen Faktors, dessen Existenz seit längerer Zeit postuliert worden war und dessen Syntheseort interessanterweise im Herzen liegt, rief eine intensive Forschungstätigkeit auf diesem Gebiet hervor (11). Bereits innerhalb der folgenden Jahre wurden verschiedene ANF-Peptide von mehreren Arbeitsgruppen isoliert, sequenziert und synthetisiert (9). Mittels der Klonierung der zur mRNS komplementären DNS-Sequenzen konnte gezeigt werden, daß in der Herzmuskelzelle zunächst ein kurzlebiges prepro-Peptid mit 152 (Ratte) bzw. 151 Aminosäuren (Mensch) synthetisiert wird (12) (Abb. 1). Durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz von 24 (Ratte) bzw. 25 Aminosäuren (Mensch) entsteht der ANF-Vorläufer pro-ANF (2,13) (Abb. 1). Pro-ANF gelangt über die Zisternen des endoplasmastischen Retikulums in den Golgi-Apparat, wo es in Sekretgranula gespeichert wird (13,14). Ein Arginin-Arginin-Rest am C-terminalen Ende des pro-Peptids der Ratte wird wahrscheinlich während des Transports in den Golgi-Apparat oder erst innerhalb der Granula abgetrennt (13). Die Sekretion des Peptids in die Blutbahn erfolgt, nachdem aus pro-ANF durch eine membrangebundene Serin-Protease ANF abgespalten wurde (15,16,17) (Abb. 1). Der Reiz für die Freisetzung des ANF ist eine Dehnung der Atrien (18). Diese kann durch eine mechanische Reizung mittels einer Sonde (19,20), durch Erhöhung des intravasalen Flüssig-

keitsvolumens (21,22), durch Wasserimmersion (2,23) oder Applikation kreislaufwirksamer Pharmaka (Vasopressin, Phenylephrin, Angiotensin II) (23,24) erreicht werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß verschiedene Pharmaka, wie z.B. Clonidin (25,26), in der Lage sind, den ANF-Plasmaspiegel signifikant zu erhöhen, ohne hämodynamische Veränderungen im Sinne einer Blutdrucksteigerung zu bewirken.

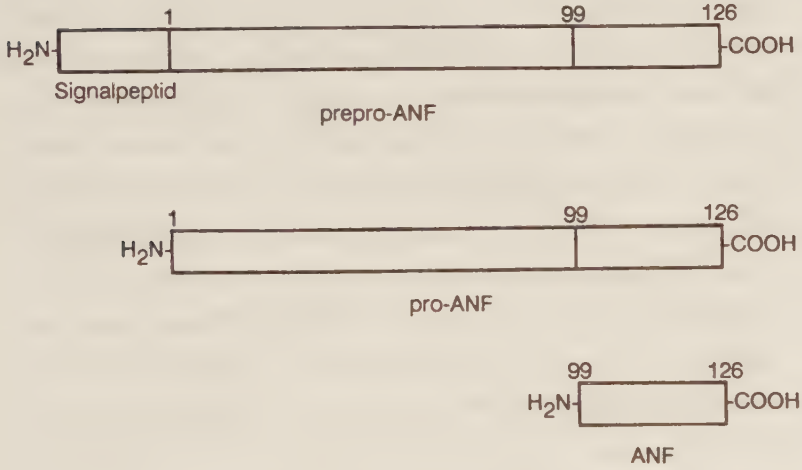


Abb. 1: Schematische Darstellung der ANF-Peptide des Herzens (Mensch).

ANF wird mit dem Blut an seine Zielorgane, die spezifische Rezeptoren für dieses Peptid aufweisen, transportiert (2,27,28). An der Niere bewirkt es insbesondere

eine signifikante Zunahme des Harnvolumens, verbunden mit einer beträchtlichen Natrium-Ausscheidung (29). Welcher Mechanismus der ANF-Wirkung in der Niere zugrunde liegt, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Diskutiert werden eine Veränderung hämodynamischer Parameter und eine Beeinflussung tubulärer Funktionen (29). Der blutdrucksenkende Effekt des ANF soll vornehmlich durch dessen vasodilatierende Eigenschaft bedingt sein (11,30). Interessanterweise konnte auch ein relaxierender Effekt auf die glatte Muskulatur des Darmes nachgewiesen werden (30). An der Nebenniere hat ANF einen direkten Einfluß auf die Freisetzung von Aldosteron (31). ANF bzw. ANF-ähnliche Peptide bewirken weiterhin eine Senkung des Vasopressin-(ADH-)Plasmaspiegels, indem sie dessen Sekretion aus dem HHL inhibieren (32). Die Rezeptoren des ANF für diesen Mechanismus sind im Hypothalamus lokalisiert. Deren Aktivierung bewirkt eine Hemmung der elektrischen Aktivität Vasopressin-sezernierender Neurone (33). Der Syntheseort der an Gehirnstrukturen wirksam werdenden ANF-Peptide liegt im ZNS selbst, nicht im Herzen (34,35).

ANF vermittelt seine Wirkung über spezifische Rezeptoren, die mit einem "second messenger" gekoppelt sind (2). Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem ANF ergaben, daß hochaffine Rezeptoren für ANF u.a. in Arterien, Nieren, Nebennieren und ZNS vorhanden sind (2,27,28). Zumindest eine der bisher identifizierten ANF-Rezeptorpopulationen ist an die Guanylatzyklase gekoppelt (36,37). Die ANF-Effekte an der glatten Muskulatur der Gefäße und an

der Nebenniere werden wahrscheinlich ebenfalls durch den "second messenger" c-GMP vermittelt (2).

Das Herz ist nach dem derzeitigen Wissensstand der Hauptsyntheseort für Atriale Natriuretische Peptide. Das aus dem Herz freigesetzte ANF ist durch seine Wirkung auf Niere, Gefäßsystem und Nebenniere wesentlich an der Regulation des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und damit des Blutdrucks beteiligt (4). Neueren Erkenntnissen zufolge wurden ANF-Peptide auch in einer Reihe anderer Organe nachgewiesen (34,35,38,39,40,41). Es gibt Hinweise dafür, daß dem ANF weitere Funktionen als der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts zukommt. So sind z.B. im Gehirn der Ratte ANF-enthaltende Neurone demonstriert worden, die nicht mit der Kontrolle kardiovaskulärer Parameter in Verbindung gebracht werden können (28). ANF hat hier möglicherweise Neurotransmitter- bzw. Neuromodulatorfunktion (28).

Die Informationen über Atriale Natriuretische Peptide in extrakardialen Geweben stammen primär aus immunhistochemischen Untersuchungen (38,39,41). Qualitative Charakterisierungen von ANF-Peptiden mittels biochemisch-immunologischer Methoden sind nur für wenige Organe beschrieben (34,35,40). Quantitative Bestimmungen wurden in den Organen bisher nicht durchgeführt, obwohl gerade die Messung von Gewebsspiegeln und deren pharmakologische Manipulation zum Verständnis der Funktionen von ANF-Peptiden beitragen kann.

2. PROBLEMSTELLUNG

Seit der erstmaligen Identifizierung von ANF in den Speicheldrüsen der Ratte (38), d.h. außerhalb des Herzens, ist auch in anderen Organen nach ANF-Peptiden gesucht worden. Hierbei konnte vorwiegend mittels immunhistochemischer Techniken ANF-Immunreaktion u.a. in der Nebenniere (39), der Niere (39), der Lunge (40) und dem Pankreas (41) identifiziert werden. Diesen Befunden steht jedoch gegenüber, daß keine Informationen über nähere Charakterisierung und Quantifizierung der ANF-Peptide vorliegen. Dies könnte auf besondere Schwierigkeiten bei der Identifizierung und quantitativen Erfassung von ANF mittels biochemisch-immunologischer Methoden zurückzuführen sein. Andererseits liegen umfangreiche Erfahrungen mit der Isolierung von Peptiden aus biologischem Material und deren qualitativer und quantitativer Erfassung vor. Hierbei ist insbesondere auf das Studium der vielfältigen Opioidpeptide zu verweisen, so daß diese Techniken zur Orientierung herangezogen werden könnten (42,43,44).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit dem Problem des qualitativen und quantitativen Nachweises von Atrialen Natriuretischen Peptiden aus verschiedenen Organen und Tierspezies. Dabei wurden die Techniken der Extraktion, der Isolierung mittels verschiedener analytischer Methoden und der Detektion mittels spezifischer Antikörper zunächst am Beispiel der ANF-Peptide des Herzens erarbeitet, da dieses Organ diesbezüglich am

besten untersucht wurde (45,46,47,48). Danach sollten durch Anwendung der geeigneten Techniken ANF-Peptide aus anderen Organen isoliert, charakterisiert und insbesondere deren Quantität bestimmt werden. Das Augenmerk richtet sich hierbei einerseits auf Organe, die bekannterweise bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts eine besondere Rolle spielen, andererseits lassen die nicht mit dem Wasserhaushalt zusammenhängenden Funktionen der ANF-Peptide die Suche nach diesem Peptiden in anderen Organen gerechtfertigt erscheinen.

3. MATERIALIEN

3.1. Tiere

Zur Organentnahme wurden männliche Ratten (Sprague-Dawley) (200-400 g) und Meerschweinchen (300-600 g) verwendet. Die Gewinnung von Antikörpern wurde an männlichen Kaninchen ("Rote Neuseeländer") mit einem Gewicht von 3 kg durchgeführt. Alle Tiere stammten aus institutseigener Zucht. Für die Versuche an isolierten Organen wurden Eintagsküken der Rasse "Weiße Leghorn" (Gut Heinrichsruh, Langenbach/Obb.) verwendet.

Die Ratten wurden in Käfigen in Gruppen von 4 Tieren gehalten und erhielten standardisierte Versuchstierdiät (Alma-Futter, Botzenhardt KG, Kempten) und Wasser zur freien Aufnahme. Die Haltung der Meerschweinchen erfolgte in großen Gruppen in entsprechenden Boxen. Auch ihnen stand standardisiertes Futter (Alma-Futter, Botzenhardt KG, Kempten) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Befruchtete Hühnereier wurden in einem Kleinmotorbrüter mit automatischer Wendung alle 4 h bei 37.8°C und einer relativen Luftfeuchte von 60 % ausgebrütet.

3.2. Geräte

Analytische Säulen : 9 mm x 1000 mm (Abimed, Düsseldorf)

HPLC (Beckman, München):

Kontrolleinheit: 421 Controller

Pumpen: 114 Solvent Delivery Module

Einspritzblock: 210 Sample Injection Valve

Säulen: Spherogel TSK (10 µ, 7.5 mm x 300 mm)

Ultrasphere ODS (5 µ, 2.0 mm x 150 mm)

Ultrasphere ODS (5 µ, 4.6 mm x 250 mm)

Fraktionssammler:

Bromma 2070 Ultrorec II (LKB, München)

Fraction Collector Frac-100 (Pharmacia, Freiburg)

Schlauchpumpen: Minipuls 2 (Abimed, Düsseldorf)

Spektrophotometer: Biochrom Ultraspec II (LKB, München)

Zentrifugen:

RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge

(Sorvall Instruments, Du Pont, Delaware, U.S.A.)

Minifuge RF (Haereus-Christ, Osterode)

Biofuge A (Haereus-Christ, Osterode)

Homogenisatoren:

Polytron PTA 10S, Drehzahlregler

(Kinematica GmbH, Littau-Luzern, Schweiz)

RW 20 (Bachofer, Reutlingen)

Speed-Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen)

Ultraschallbad: Sonorex TK 52 Transistor (Bandelin electronic, Berlin)

Gefrierschrank (-70°C): GFL (Bavaria, Kälte- und Klimatechnik GmbH, Garching)

Mikrowellenherd (Bauknecht, Schorndorf)

pH-Meter (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim)

Gamma-Zähler: 1272 Clini Gamma (LKB, München)

Kraftaufnehmer: Q 11 (Hottinger-Baldwin-Meßtechnik, Darmstadt)

Schreiber: BD 41 (Kipp-Zonen, Delft, Holland)

Verstärker: TFV (Hottinger-Baldwin-Meßtechnik, Darmstadt)

Kleinmotorbrüter: KBM 2 (Ehret, Emmendingen)

Membranfilter: Centricon 30 Microcentrator (Amicon, Danvers, MA, U.S.A.)

SEP-PAK C_{18}-Cartridges (Millipore/Waters, Milford, MA, U.S.A.)

3.3. Sustanzen

3.3.1. Atriale Natriuretische Peptide

Die Nomenklatur dieser Peptide orientiert sich an einer internationalen Empfehlung (48). Pro-ANF wird demnach als ANF(1-126) und ANF als ANF(99-126) bezeichnet. ANF(1-126)-Peptidfragmente werden mit der exakten Angabe ihrer Aminosäurensequenz benannt. Die Bezeichnungen prepro-ANF, pro-ANF und ANF dürfen weiter verwendet werden.

verwendete Peptide:

rat ANF(99-126)	: Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
rat ANF(103-126)	: Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
rat ANF(103-123)	: Dr. R. E. Lang, Heidelberg
rat ANF(101-126)	: Dr. R. E. Lang, Heidelberg
rat ANF(2-126)	: Dres. Schöne, Preibisch u. Seipke, Hoechst AG, Frankfurt
human ANF(1-30)	: Peninsula Laboratories, Belmont, Cal., U.S.A.

3.3.2. Radioaktiv markierte Substanzen

(3-[^{125}I]-iodotyrosyl^{126}) rat ANF(99-126):

Amersham, Braunschweig

(3-[^{125}I]-iodotyrosyl^{4}) rat ANF(1-30):

Peninsula Laboratories, Belmont, Cal., U.S.A.

3.3.3 Antikörper

"Loisl II"

"Toni III": Dr. R. M. Arendt, München

"17/26" : J. Gutkowska, Ph. D., Montreal

"GT-23" : M. Cantin, M. D., Ph. D., Montreal

3.3.4. andere Sustanzen

XAD-4 Adsorberharz (Serva, Heidelberg)

Sephadex G-50 fine (Pharmacia, Freiburg)

SP Sephadex C-25 (Pharmacia, Freiburg)

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München)

Alle weiteren verwendeten Substanzen waren mindestens von analytischer Reinheit und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

4. METHODEN

4.1. Organgewinnung

Die Tiere wurden dekapitiert, die benötigten Organe sofort entnommen und in kalter (4°C) physiologischer NaCl-Lösung von anhaftendem Blut bzw. Darminhalt befreit. Die Gewebe wurden sofort nach der Entnahme aufgearbeitet. Einige der Rattenatrien wurden bis zur Extraktion eingefroren (-70°C). Die Herzvorhofteile von Rind und Schwein wurden in gekühltem Zustand transportiert und ebenfalls eingefroren (-70°C).

4.2. Extraktionen

4.2.1. HCl-Extraktion

Die Gewebeextraktion in 0.1 N Salzsäure diente als Standardmethode. Das jeweilige Organ (1 g Gewebe/10 ml 0.1 N HCl) wurde für 2 min bei 95°C extrahiert, anschließend homogenisiert (Polytron, Stufe 8, 15 sec), und das Homogenat weitere 2 min bei 95°C extrahiert. Herzvorhöfe von Ratten (200-250 g) wurden in 3 ml 0.1 N HCl pro Vorhof extrahiert. Bindegewebsarme und deshalb entsprechend weiche Organe, z.B. dekapsulierte Hoden, wurden im Potter homogenisiert. Es folgte ein Abkühlen des Homogenats auf 4°C, um es zu zentrifugieren (15000 x g, 10 min, 4°C). Der klare Überstand wurde vorsichtig abgezogen, das Pellet verworfen.

4.2.2. Essigsäure-Extraktion

Die Extraktion in 2 M Essigsäure wurde für Herzvorhöfe und Meerschweinchendarm angewendet. Das Gewebe wurde in 10fachem Volumen der Essigsäure in der Kälte homogenisiert (Polytron) und sofort danach erhitzt (95°C, 10 min) und zentrifugiert (15000 x g, 10 min, 4°C) (50). Der Überstand wurde analysiert.

4.2.3. HCl-Aceton-Extraktion

10 g Darm wurden in einem 12.5 N HCl-Aceton-Gemisch (2.5 : 97.5 v/v, 3 ml/g Gewebe) homogenisiert (Polytron) und anschließend zentrifugiert (1000 x g, 15 min, 4°C). Im Eisbad wurde unter Rühren das 3fache Volumen Aceton zugegeben und über Nacht stehengelassen. Das entstandene Präzipitat wurde über eine Glasfritte abgetrennt und der Niederschlag mit Aceton nachgewaschen. Das Präzipitat wurde in 200 µl 0.1 M Essigsäure aufgenommen, zentrifugiert (2500 x g) und der Überstand gelchromatographiert (51). Als positive Kontrolle wurden entsprechend geringere Gewebemengen von Herzvorhöfen extrahiert.

4.2.4. HCl-Heptan-Extraktion

1 g Darm wurde mit der Schere zerkleinert und in 5 ml 0.1 N HCl für 10 min auf eine Temperatur von 95°C erhitzt. Es folgte Homogenisieren im Polytron (Stufe 8, 15 sec) und Zentrifugieren (15000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde durch Zugabe von 5 Volumeneinheiten

Heptan partiell entfettet (52) und über ein C_{18}-Cartridge gegeben.

4.2.5. Organextraktion in Gegenwart von Enzymhemmern

Folgende Enzymhemmer kamen zur Anwendung:

PMSF (10^{-5} M)

Pepstatin A (5×10^{-6} M)

EDTA (0.1 %)

Waschen und Präparieren der Organe wurden in physiologischer NaCl-Lösung in Gegenwart von Enzymhemmern (PMSF, EDTA, Pepstatin A) vorgenommen. PMSF und EDTA wurden bei der salzsauren Extraktion von Darm und Atrien eingesetzt (40).

4.2.6. Organextraktion in Gegenwart von SDS, Triton X-100, Harnstoff oder NaCl

Die HCl-Extraktion wurde in Gegenwart von 1 % SDS, 0.2 % Triton X-100, 2 M NaCl oder 6 M Harnstoff durchgeführt.

4.2.7. Wiederfindungsversuche

Organhomogenaten wurde als interner Standard 5000 fmol synthetisches rat ANF(99-126) bzw. ANF(2-126) zugefügt, um zu ermitteln, welcher Anteil der applizierten Substanz nach Extraktion, Vorreinigung und Gelchromatographie zu detektieren war. Das Gewebe wurde vorher in PBS-Puffer homogenisiert und bei 37°C 1 h inkubiert. Aufgrund der hohen Enzymaktivität in den Geweben wurden unter diesen

Bedingungen die endogenen ANF-Peptide abgebaut. Bei den Wiederfindungsversuchen von synthetischem rat ANF(99-126) bzw. rat ANF(2-126) wurde 0.5 g des jeweiligen Gewebes in 5 ml PBS homogenisiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Homogenat wurde nach Einstellung auf pH 1 mit 1 N HCl erhitzt und ANF(99-126) bzw. ANF(2-126) (5000 fmol) zugesetzt. Entsprechend dem Protokoll der HCl-Extraktion folgte Erhitzen, Homogenisieren, Erhitzen, Abkühlen und Zentrifugieren. Die Überstände wurden nach Vorreinigung über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.) auf Sephadex G-50-Säulen (siehe 4.9.) aufgetragen und ein Aliquot der Fraktionen im RIA gemessen. Als Kontrolle diente 0.5 g Homogenat, dem kein synthetisches rat ANF(99-126) bzw. rat ANF(2-126) zugesetzt war.

Wiederfindungsversuche mit ^{125}I-markiertem rat ANF(99-126) wurden ebenfalls durchgeführt: Der Zusatz eines markierten Peptides macht es möglich, die vorhandene Radioaktivität in jedem Schritt des Versuchsablaufes festzustellen. Radioaktiv markiertes ANF(1-126) stand nicht zur Verfügung.

4.3. Vorreinigung

4.3.1. C_{18}-Cartridges

Zur Anwendung kamen SEP-PAK C_{18}-Cartridges. Die mit C_{18}-Material gefüllten Cartridges wurden zur Aktivierung mit 5 ml Acetonitril (100 %) und anschließend mit 10 ml Wasser gewaschen. Mit Einmalspritzen wurden die Organ-

überstände über die Cartridges gegeben und diese mit 20 ml 0.1 % TFA gewaschen. Das Waschen entfernt polare Substanzen. Die Elution der ANF-Peptide erfolgte mit 3 ml 60% Acetonitril in 0.1 % TFA. Das Eluat wurde im Speed-Vac eingeengt.

4.3.2. XAD-4

"Säulen-Verfahren"

Je 250 mg des Adsorberharzes XAD-4 wurden in Pasteurpipetten gefüllt. Ein Glaswoll-Stopfen verhinderte das Herauslaufen des Materials. Zur Aktivierung des Adsorberharzes wurden die Säulen über eine Schlauchpumpe (Flußrate 10 ml/h) mit 5 ml Methanol (100 %) beschickt. Danach wurde das Adsorberharz durch Ansaugen von Luft über die Pumpe getrocknet und mit je 10 ml Wasser und 0.1 % TFA gewaschen. Das Auftragen der Organüberstände geschah ebenfalls mit einer Schlauchpumpe (Flußrate 10 ml/h). Es wurde mit 10 ml 0.1 % TFA nachgewaschen und mit 3 ml 60 % Acetonitril in 0.1 % TFA eluiert.

"Batch-Verfahren"

Aktiviertes XAD-4-Adsorberharz (0.5 g) wurde direkt in das Organhomogenat (1 g Gewebe/10 ml 0.1 N HCl) gegeben und dieser Ansatz bei 4°C für 60 min geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (15000 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml 60 % Acetonitril in 0.1 % TFA versetzt. Nach 30minütigem Schütteln (4°C) wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgezogen und im Speed-Vac eingeengt.

Bei Versuchen zur Wiederfindung von ^{125}I-rat ANF(99-126) mit XAD-4 wurden dem Tracer (40000 CPM) zur Erniedrigung der spezifischen Aktivität 5000 fmol rat ANF(99-126) zugefügt und dieser zusammen mit dem Gewebe (1 g) in 10 ml 0.1 N HCl gegeben. Die Acetonitril-Eluate wurden im γ-Counter gemessen. Im "Batch-Verfahren" entspricht der Überstand nach der zweiten Zentrifugation dem Eluat.

4.3.3. SP-Sephadex C-25

Das Gel wurde wie XAD-4 in Pasteur-Pipetten eingefüllt und mit 1 M Essigsäure aktiviert. Die essigsauren Organüberstände wurden mit der Schlauchpumpe (Flußrate 10 ml/h) aufgetragen. ANF liegt in Essigsäure schwach dissoziiert vor und wird von dem starken Kationenaustauscher SP-Sephadex C-25 gebunden. Die Elution erfolgte mit dem stärker basischen Pyridin (2 M, 3 ml) (53).

4.3.4. Ultrafiltration

Zur Anwendung kamen Membranfilter (Centricon 30) mit einer Ausschlußgrenze von MG = 30000. Es wurde 1 ml Organextrakt pro Filter zentrifugiert (5000 x g). Das Ultrafiltrat wurde lyophilisiert.

4.4.Antiserumgewinnung

4.4.1. Kopplung von rat ANF(99-126) an Thyreoglobulin (54

1 mg lyophilisiertes rat ANF(99-126) wurde in 350 µl Phosphatpuffer (0.5 M; pH 7.4) gelöst und an 5 mg in 1 ml Wasser gelöstes Rinderthyreoglobulin gekoppelt. Die Reaktion erfolgte mit Hilfe von 0.8 mg Carbodiimid in 300 µl Wasser. Das Kopplungsgemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert und für 24 h bei 4°C gegen 6 l physiologische NaCl-Lösung dialysiert (Ausschlußgrenze des Dialyseschlauchs 8000 Dalton).

4.4.2. Herstellung einer Emulsion mit Freundschem Adjuvans, Immunisierung

Das gekoppelte rat ANF(99-126) wurde mit physiologischer NaCl-Lösung auf die Hälfte des gewünschten Endvolumens aufgefüllt und zu gleichen Teilen mit komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert.

Zur Antikörpergewinnung wurde 1 ml Emulsion (enthält 300 µg ANF) pro Kaninchen intradermal an mehreren Stellen des Rückens injiziert. Boosterungen wurden im Abstand von 4 Wochen mit einer geringeren Menge Antigen (100 µg ANF) durchgeführt.

4.5. Titerbestimmung

4 Wochen nach der dritten Immunisierung wurde dem Kaninchen Blut aus der Ohrrandvene entnommen. Aus dem Serum wurde eine Verdünnungsreihe in Puffer D (siehe 4.6.) hergestellt. Entsprechend der unter 4.6. beschriebenen RIA-Methode 1 für rat ANF(99-126) wurden 350 µl Puffer D vorgelegt und jeweils 100 µl der Antiserum-Verdünnung plus 50 µl (10000 CPM) radioaktiv markiertes rat ANF(99-126) dazugegeben. Nach Inkubation über Nacht (4°C) wurden zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem ^{125}I-Tracer 500 µl Aktivkohle zugefügt, zentrifugiert (10 min, 1000 x g, 4°C) und 800 µl Überstand im γ-Counter gemessen. Als Titer wurde diejenige Antiserumverdünnung definiert, bei der 30 % des zugesetzten ^{125}I-ANF an das Antiserum gebunden wird.

Das Antiserum des Kaninchens "Loisl" wies nach der dritten Immunisierung einen Titer von 1:12000 (Charge II des Antiserums) und nach der 4. Immunisierung einen Titer von 1:20500 (Charge III des Antiserums) auf. In diesen Verdünnungen wurde das Antiserum für den RIA eingesetzt.

4.6. RIA-Techniken

Methode 1 (55):

Bei dieser RIA-Methode wurden Antikörper zur Detektion verwendet, die gegen ANF(99-126) bzw. ANF(101-126) gerichtet sind.

Puffer:

Puffer C:

0.02 M Phosphatpuffer; 0.15 M NaCl; 0.01 % BSA;

0.1 % Gelatine; 0.01 % Thimerosal; pH 7.4

Puffer D:

Puffer C mit 0.1 % Triton X-100

Kohle-Suspension:

1.25 % Aktivkohle, 0.5 % BSA in Puffer C

Standard:

rat ANF(99-126)

5000, 1000, 500, 250 bis 0.5 fmol in 50 µl Puffer D

Tracer:

^{125}I-rat ANF(99-126):

Spezifische Aktivität ca. 2000 Ci/mmol

Gebrauchslösung 10000 CPM in 50 µl Puffer D

Antiseren:

"Loisl II": Titer 1:12000

"Toni III": Titer 1:24000

"17/26" : Titer 1:32000

Verdünnung in Puffer D

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden 300 µl Puffer D mit 50 µl rat ANF(99-126)-Standard, 100 µl Antiserum und 50 µl ^{125}I-Tracer versetzt. Die Standardprobe wurde 12 bis 16 h bei 4°C inkubiert. Zur Trennung von freiem und

gebundenem ^{125}I-Tracer wurden 500 µl Kohlesuspension zugefügt, 10 min inkubiert (4°C) und anschließend zentrifugiert (10 min, 1000 x g, 4°C). 800 µl des Überstandes wurden abpipettiert und im γ-Counter gemessen. Grundsätzlich wird freies ^{125}I-ANF(99-126) von der Kohle adsorbiert, während der antikörpergebundene Tracer im Überstand bleibt. Für jede Messung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus den Werten C_0 (Wert ohne Zugabe eines Standards) und C_t (allein ^{125}I-Tracer) läßt sich die Bindung des Antiserums bestimmen. Zur Quantifizierung von ANF-Peptiden wurden die lyophilisierten Proben mit 50 µl Puffer D aufgenommen und anschließend wie zur Erstellung einer Eichkurve behandelt. Der lineare Bereich der Standardkurve wird zur Bestimmung unbekannter Peptidkonzentrationen herangezogen. Die Nachweisgrenze ist mit 90 % des Nullwertes definiert. Dies entspricht der Konzentration an Substanz, die 10 % des Tracers aus der Bindung verdrängt.

Methode 2 (56):

Bei der Methode 2 wurde das Antiserum "GT-23" zur Detektion verwendet. Es ist gegen das Fragment ANF(11-37) gerichtet.

Puffer:

Puffer M: 0.05 M Phosphatpuffer; 0.05 M NaCl; 0.1 % BSA; 0.01 % NaN_3; 0.1 % Triton X-100; pH 7.4

Standard:

human ANF(1-30)

5000, 1000, 500, 250 bis 0.5 fmol in 100 µl Puffer M

Tracer:

^{125}I-human ANF(1-30):

Spezifische Aktivität ca.1200 Ci/mmol

Gebrauchslösung 8000 CPM in 100 µl Puffer M

Antiserum:

"GT-23": Titer 1:40000

Verdünnung in Puffer M

100 µl human ANF(1-30)-Standard wurde mit 400 µl RIA-Puffer, 200 µl Antiserum und 100 µl ^{125}I-Tracer (8000 CPM) für 48 h bei 4°C inkubiert. Den lyophilisierten Proben wurden 500 µl RIA-Puffer vorgegeben. Die Trennung von freiem und gebundenem ^{125}I-human ANF(1-30) erfolgte durch Zugabe von 200 µl 4 % "goat-anti-rabbit" IgG ("second antibody"), 200 µl 2 % Kaninchenserum und 1 ml 12.5 % PEG 8000 und Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Der zweite Antikörper reagiert spezifisch mit dem ersten Antikörper, so daß sich ein Präzipitat bildet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 20 min bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Radioaktivität des Pellets gemessen.

4.7. Antiserumcharakterisierung

Antiseren können eine Kreuzreaktivität mit Peptiden zeigen, deren Aminosäurensequenz Übereinstimmungen mit dem Antigen aufweisen. Zeigt der gewonnene Antikörper Kreuzreaktivitäten mit mehreren ANF-Peptiden, so sollten diese aufgetrennt, z.B. mittels Gelchromatographie oder HPLC, und in einem RIA-System individuell detektiert werden. Wird dies versäumt, kann allein die Gesamtimmunreaktion bestimmt werden, womit eine Information über ein spezifisches Peptid nicht notwendigerweise gegeben ist.

Kreuzreaktivitäten werden ermittelt, indem man die RIA-Standardkurve des Peptids, gegen das immunisiert wurde, mit Eichkurven vergleicht, in denen andere ANF-Peptide als Standard verwendet wurden. Folgende Beziehung gilt:

$$P = 100 : F$$

Dabei ist P die Kreuzreaktivität in % und F der Faktor, um den die Eichkurve des auszutestenden Peptids gegen die Standardkurve verschoben ist. Da man häufig keine parallel verschobenen Kurven erhält, wird die Kreuzreaktivität bei 50%iger Bindung angegeben.

Zur Antiserumgewinnung dienten für die angegebenen Antikörper Kaninchen. Im einzelnen wurden folgende Antiseren verwendet:

anti-rat ANF(99-126) : Antiserum "Loisl"
anti-human ANF(99-126): Antiserum "Toni"
anti-rat ANF(101-126) : Antiserum "17/26"
anti-rat ANF(11-37) : Antiserum "GT-23"

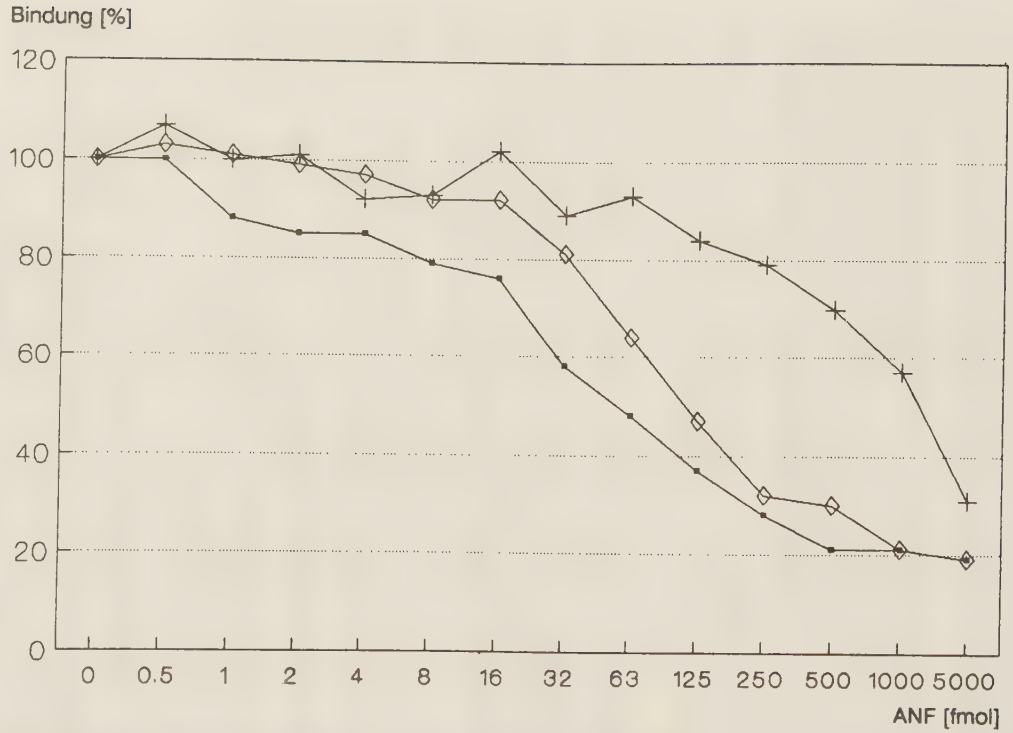


Abb. 2: Ermittlung der Kreuzreaktivitäten des Antiserums "Loisl II" mit rat ANF(99-126) (-•-), human ANF(99-126) (-+-) und rat ANF(2-126) (-◇-).

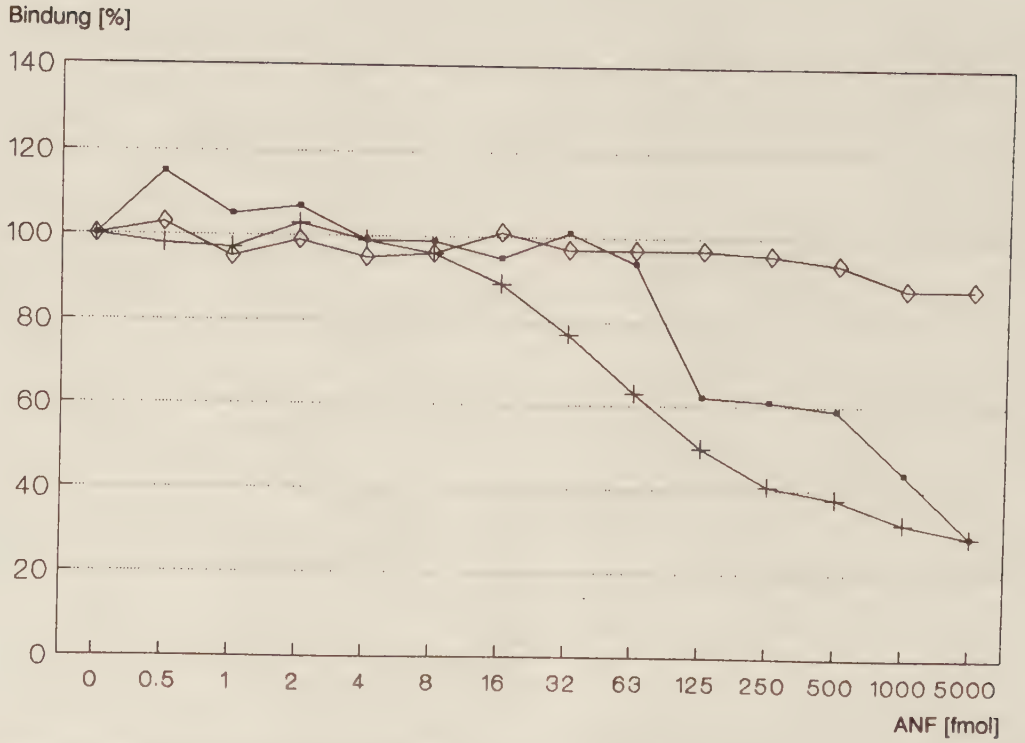


Abb. 3: Ermittlung der Kreuzreaktivitäten des Antiserums "Loisl II" mit rat ANF(103-126) (—•—), ANF(101-126) (—┼—) und ANF(103-123) (—◇—).

4.8. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Bradford-Methode (57) mittels des Bio-Rad-Kit bestimmt. Sie basiert auf der Beobachtung, daß der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 durch Bindung an Protein sein Absorptionsmaximum von 465 nm (rot) zu 595 nm (blau) verschiebt. Mit einem Standard (25 µg BSA/ml H_2O) wurde eine Eichkurve angefertigt (Bereich 2.5 bis 20 µg Protein) und bei 595 nm die Absorption gegen einen Nullwert (Verdünnungspuffer plus Farbstoff) gemessen. Zur Proteinmessung wurden Proben entsprechend verdünnt, so daß die Proteinkonzentrationen im linearen Bereich der Standardkurve lagen.

4.9. Gelchromatographie

Die über C_{18}-Cartridges vorgereinigten (siehe 4.3.1.) und lyophilisierten Organextrakte (siehe 4.2.) wurden in 200 µl 0.1 M Essigsäure aufgenommen und gelchromatographisch (Sephadex G-50 fine) analysiert. Das äquilibrierte Gel wurde vor dem Einfüllen in die Glassäulen unter reduziertem Druck entgast und BSA (0.2 %) zum Absättigen unspezifischer Seiten zugesetzt. Als Laufmittel diente 0.1 M Essigsäure. Die Fließgeschwindigkeit betrug 10 ml/h, das Volumen der gesammelten Fraktionen 2.5 ml. Die Auftrennung von Substanzen erfolgt nach Molekülgröße und -form. V_0 ist das Elutionsvolumen von Molekülen, die nur in der mobilen Phase verteilt sind, da sie größer als die Poren der Gelpartikel sind (Ausschlußvolumen). Kleinere Moleküle sind in dem Lösungsmittelkompartiment außerhalb

und innerhalb des Gels, also in einem wesentlich größeren Volumen, verteilt und wandern deshalb langsamer durch die Säule. Im Totalvolumen (V_t) eluieren Substanzen, die so klein sind, daß sie vollständig in das Gel eindringen können und damit die längste Retentionszeit aufweisen. Sephadex G-50 ist ein polymerisiertes Dextran. Es hat für Peptide und globuläre Proteine einen Trennbereich von MG = 1500 bis 30000 (58). Die Bestimmung von Ausschluß- und Totalvolumen erfolgte mit BSA (MG 66000) und Vitamin B_{12} (MG 1350) (Abb. 4). Die Säulen wurden mit synthetischen rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) geeicht (Abb. 5).

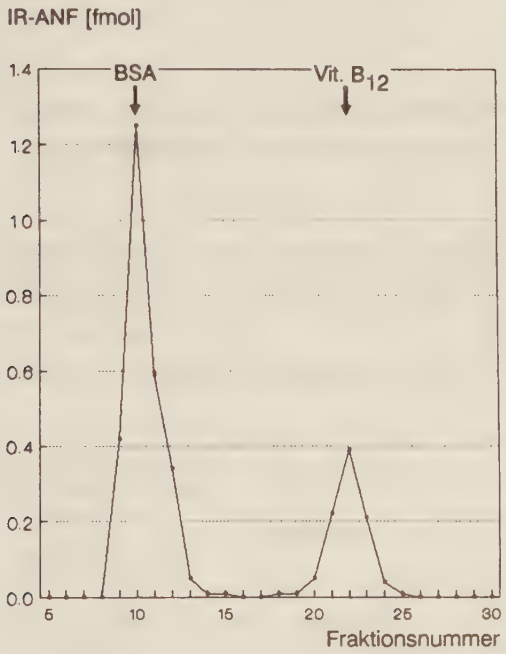


Abb. 4: Bestimmung des Ausschluß- (V_0) und Totalvolumens (V_t) einer Sephadex G-50-Säule.

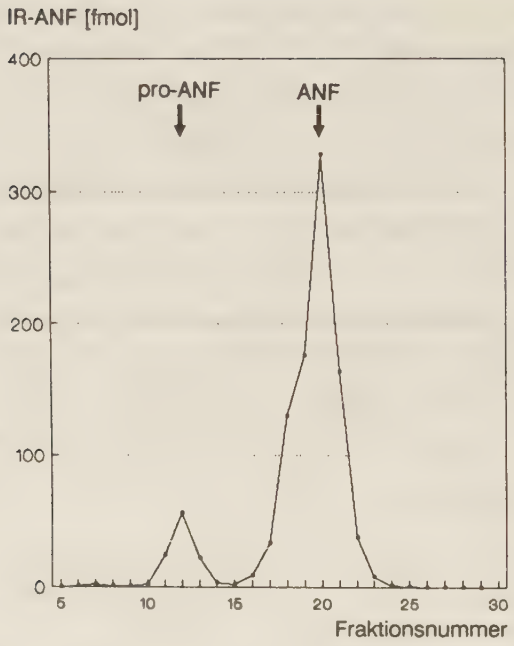


Abb. 5: Eichung einer Sephadex G-50-Säule mit synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126). Die Detektion erfolgte mit "Toni III".

4.10. HPLC

Aliquots von über Gelchromatographie (Sephadex G-50) (siehe 4.9.) vorgereinigten Proben wurden lyophilisiert und in 0.1 % TFA aufgenommen (25-100 µl). Die Injektion in das HPLC-System erfolgte über eine 20 µl-Probenschleife. Die Trennungen wurden in erster Linie mit C_{18}-Säulen unter Anwendung eines Lösungsmittelgradienten durchgeführt. Verwendet wurden die Säulen Ultrasphere ODS 2.0 mm x 150 mm und Ultrasphere ODS 4.6 mm x 250 mm. Der

Porendurchmesser des Trägermaterials betrug 5µ. Als Lösungsmittel diente Acetonitril (in 0.1 % TFA) und 0.1 % TFA. Als Flußrate für die Säule 4.6 mm x 150 mm wurden 0.2 ml/min und eine Fraktionsgröße von 0.4 ml gewählt. Bei der Säule 4.6 mm x 250 mm betrug die Flußrate 1.5 ml/min und es wurden 2.25 ml-Fraktionen gesammelt. Die Zusammensetzung des Lösungsmittels wurde mit Hilfe eines Gradientenprogramms geändert. Dafür standen 2 Pumpen zur Verfügung, die in der Säule eine konstante Durchflußgeschwindigkeit bedingten. Es wurde mit folgenden Gradienten gearbeitet: Anstieg des Acetonitrilanteils im Lösungsmittelgemisch von 10 auf 80 % in 45 min und von 20 auf 55 % in 55 min.

Trennungen nach MG wurden isokratisch (30 % Acetonitril und 70 % 0.09 % TFA mit 0.005 M Na_2SO_4 und 0.002 M NaH_2PO_4 H_2O) mit einer TSK-Säule (Spherogel TSK 7.5 mm x 300 mm) durchgeführt. Die Flußrate betrug 0.3 ml/min und die Fraktionsgröße 0.6 ml. Zur HP-GFC können verschiedene Materialien verwendet werden. TSK-Säulen arbeiten mit modifizierten Kieselgelen als stationäre, und wäßrigen Medien als mobile Phase. Ihr Trennbereich liegt bei MG = 5000 bis 100000 (59). Die TSK-Säule wurde mit BSA, Myoglobin (MG 17000), Vitamin B_{12}, rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) geeicht.

Bei der RP-Chromatographie diente als stationäre Phase eine unpolare Verbindung. Das C_{18}-Material besteht aus Kieselgel, dessen Oberfläche mit Kohlenwasserstoffketten

abgesättigt ist. Die Methode der umgekehrten Phasen ist im Gegensatz zur Chromatographie mit normalen Phasen (Adsorptionschromatographie) zur Trennung polarer Verbindungen besonders geeignet (59). Die Eichung der RP-Säulen erfolgte mit synthetischen Atrialen Natriuretischen Peptiden [rat ANF(103-126), rat ANF(99-126), rat ANF(2-126)] (Abb. 6).

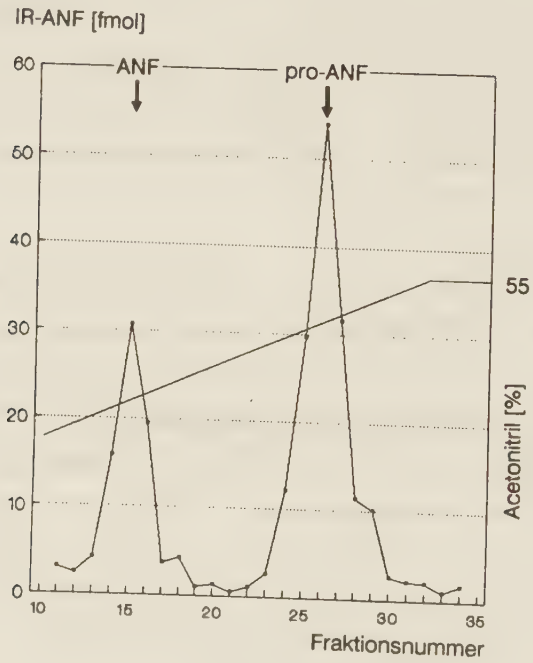


Abb. 6: RP-HPLC: Eichung der Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm mit synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) bei einem Acetonitril-Gradienten von 20 bis 55 % in 55 min. Zur Detektion wurde "Toni III" verwendet.

4.11. in vitro-Metabolisierung von ANF(1-126)

Es sollte die Abbaubarkeit des Vorläufers zu ANF(99-126) demonstriert werden. ANF(1-126) aus Organextrakten wurde über Gelchromatographie (Sephadex G-50) (siehe 4.9.) und RP-HPLC (siehe 4.10.) gereinigt. Aliquots wurden mit frischem Rattenserum bzw. gepuffertem Organüberstand versetzt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Gewinnung des Organüberstandes wurde 1 g Meerschweinchencolon in 1 ml PBS homogenisiert (Polytron) und anschließend zentrifugiert (10 min, 10000 x g). Vorgelegt wurde eine definierte Menge lyophilisiertes ANF(1-126), das in 50 µl Phosphatpuffer (50 mM mit 10 mg/ml BSA, pH 7.4) gelöst wurde. Durch Zugabe von Serum (3 µl) bzw. Organüberstand (5 µl) wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation bei 37°C erfolgte für 0, 1, 5 bzw. 15 min und wurde durch Zugabe von 100 µl 1 % TFA zum Reaktionsgemisch und Schockgefrieren in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch beendet (60). Anschließend wurde im Speed-Vac lyophilisiert und zur Analyse mittels RP-HPLC in 0.1 % TFA wiederaufgenommen.

4.12. Biologische Bestimmung von ANF-Peptiden

An isolierten Organen (Rattenaorta, Kükenrektum) kann die relaxierende Wirkung des ANF auf Gefäßmuskulatur und glatte Muskulatur des Darmes demonstriert werden (30).

Das Rektum eines Kükens wurde in einem Organbad (5 ml) in Krebs-Ringer-Lösung (37°C) aufgehängt und kontinuierlich mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast. Während einer 1stündigen Äquilibrationszeit wurde das Organ alle 10 min gewaschen. Das Kükenrektum wurde mit einem induktiven Kraftaufnehmer verbunden, der wiederum an einen Meßverstärker und einen Schreiber angeschlossen war. Die Kalibrierung des Kraftaufnehmers erfolgte mittels Gewichten (100, 500 mg). Die Basisspannung des Organs wurde auf 500 mg eingestellt. Durch 50 nM Carbachol (stabiler Cholinester) im Organbad wurde das Rektum zur Kontraktion gebracht, der induzierte Muskeltonus über den Schreiber registriert und anschließend die zugefügte Substanz durch Spülen wieder aus dem Organbad entfernt. Zur Messung der muskelrelaxierenden Eigenschaften von ANF-Peptiden wurde das Organ mit verschiedenen ANF(99-126) bzw. ANF(1-126)-Konzentrationen inkubiert und nach 1 min Carbachol (50 nM) zugefügt. Die Kontraktionskraft des Organs wurde unter diesen Bedingungen registriert.

Krebs-Ringer-Lösung: [mM]

NaCl 118; KCl 4.75; $CaCl_2 \cdot H_2O$ 2.54; KH_2PO_4 1.19;

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 1.2; $NaHCO_3$ 25; Glucose·H_2O 11;

Cholin·HCl 0.02; pH 7.6

5.ERGEBNISSE

5.1. Bindungsepitope der verwendeten Antiseren

Die in den nachfolgend beschriebenen Experimenten zur Detektion von ANF-Peptiden hauptsächlich verwendeten Antiseren "Loisl II" und "Toni III" sind gegen die C-terminale Seite von ANF(1-126) gerichtet. "Loisl II" kreuzreagiert mit rat ANF(99-126) zu 100 %, bindet jedoch human ANF(99-126) nur zu 3 % (Tab. 1), obwohl sich die Peptide nur in der Aminosäureposition 110 [rat ANF(99-126) Isoleucin, human ANF(99-126) Methionin] unterscheiden (4). "Toni III" kreuzreagiert mit human ANF(99-126) zu 100 %, erkennt aber auch rat ANF(99-126) zu 71 % (Tab. 1). Eine Verkürzung von ANF(99-126) an der C-terminalen Seite des Peptids bewirkt für beide Antiseren eine starke Abnahme der Avidität zum Antigen (Tab. 1).

Die Kreuzreaktivitäten des Antiserums "GT-23" wurden mit ^{125}I-ANF(1-98) als Tracer und ANF(1-98) als Standard ermittelt. Das Antiserum ist gegen das N-terminale Fragment von rat ANF(1-126) gerichtet. Es bindet nicht an human ANF(31-67), rat ANF(99-126) und rat ANF(103-126). Mit human ANF(1-30), rat ANF(1-98), rat ANF(1-126) und rat ANF(11-37) zeigt es Kreuzreaktivitäten von 100 % (16).

Bei allen der unter 5.2., 5.3. und 5.4. angeführten Ergebnisse wurden die Kreuzreaktivitäten der zur Detektion verwendeten Antiseren mit den gemessenen ANF-Peptiden berücksichtigt. Bei der Berechnung wurde die Kreuzreak-

tivität bei 50%iger Bindung zugrunde gelegt. Da die genaue Aminosäurensequenz von Meerschweinchen-ANF(1-126) bisher nicht bekannt ist, wurden dieselben Kreuzreaktivitäten unterstellt, wie sie mit synthetischem rat ANF(2-126) für die entsprechenden Antiseren ermittelt wurden.

Aus den in Tab. 1 aufgeführten Kreuzreaktionen der Antiseren mit verschiedenen ANF-Peptiden können die Bindungsepitope umrissen werden, die vom jeweiligen Antiserum als antigene Struktur erkannt werden. In Abb. 7 sind diese Bereiche für die Antiseren "Loisl II", "Toni III" und "GT-23" dargestellt.

Tab. 1: Kreuzreaktivitäten [%] der Antiseren "Loisl II", "Toni III" und "17/26".

Peptide	"Loisl"	"Toni"	"17/26"
rat ANF(99-126)	100	71	100
human ANF(99-126)	3	100	2
rat ANF(103-126)	7	13	47
rat ANF(103-123)	<1	<1	23
rat ANF(101-126)	67	38	*
rat ANF(2-126)	48	27	56

* nicht durchgeführt

Tab. 2: Nachweisgrenze [fmol] der Antiseren "Loisl II", "Toni III" und "17/26".

Peptide	"Loisl"	"Toni"	"17/26"
rat ANF(99-126)	0.5	1.0	0.6
human ANF(99-126)	80	0.5	1.8
rat ANF(103-126)	80	18	1.0
rat ANF(103-123)	20	0	1.1
rat ANF(101-126)	11	12	*
rat ANF(2-126)	11	3.4	5.5

* nicht durchgeführt

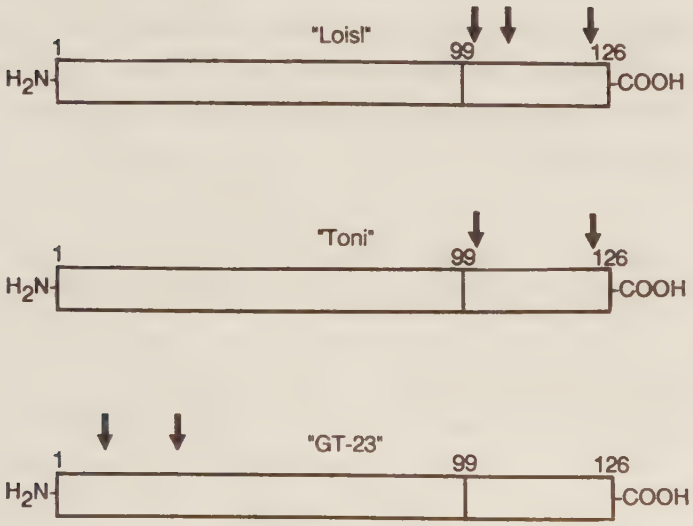


Abb. 7: Bindungsepitope der Antiseren "Loisl II", "Toni III", und "GT-23". Die Pfeile markieren Aminosäurenbereiche, die für die Erkennung des Antigens bedeutsam sind.

5.2. Vorversuche

5.2.1. Extraktion

In Abwesenheit von biologischem Material wurden 125, 63 und 32 fmol synthetisches rat ANF(99-126) und rat ANF (2-126) in Doppelbestimmungen einer HCl-Extraktion (3 ml 0.1 N HCl/Ansatz) unterzogen (siehe 4.2.1.). Als Kontrolle wurden dieselben Konzentrationen der synthetischen Peptide (in 50 µl Puffer D) ohne vorherige Extraktion im RIA gemessen.

Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Stabilität von ANF-Peptiden gegenüber sauren Medien und der Einwirkung von Hitze zu demonstrieren. Es zeigte sich, daß nach der Extraktion von ANF(99-126) bzw. ANF(2-126) in 0.1 N HCl, im Vergleich zur direkten Messung der Peptide, annähernd gleiche Quantitäten an Immunreaktion detektiert wurden (Tab. 3,4).

Tab. 3: Wiederfindung [fmol] von synthetischem rat ANF (99-126) nach Extraktion in 0.1 N HCl und nach direkter Bestimmung im RIA. Die Detektion erfolgte mit "Loisl II".

eingesetzte Menge an ANF(99-126) [fmol]	detektierte Menge an ANF(99-126) [fmol]	
	RIA direkt (n = 2)	nach Extraktion in 0.1 N HCl (n = 2)
125	114 104	119 101
63	55 74	63 52
32	40 24	35 28

Tab. 4: Wiederfindung [fmol] von synthetischem rat ANF(2-126) nach Extraktion in 0.1 N HCl und nach direkter Bestimmung im RIA. Die Detektion erfolgte mit "Toni III".

eingesetzte Menge an ANF(2-126) [fmol]	detektierte Menge an ANF(99-126) [fmol]	
	RIA direkt (n = 2)	nach Extraktion in 0.1 N HCl (n = 2)
125	137 163	159 133
63	44 41	59 44
32	15 15	15 19

5.2.2. Vorreinigung

Zur Prüfung der Eignung der C_{18}-Cartridges zur Vorreinigung von ANF(99-126) bzw. ANF(1-126)-haltigen Organextrakten sind ebenfalls Wiederfindungsversuche mit synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) in Abwesenheit von Gewebe erforderlich. Es wurden 125 fmol rat ANF(99-126) bzw. 500 fmol rat ANF(2-126) in 3 ml 0.1 N HCl über je ein Cartridge gegeben. Das im Speed-Vac eingeengte Acetonitril-Eluat wurde in den RIA eingesetzt. Die Wiederfindung von rat ANF(99-126) mit "Loisl II" betrug 70 % (n = 6, σ* = 10 %), von rat ANF(2-126) 63 % ("Toni III") (n = 4, σ = 15 %) bzw. 85 % ("Loisl II") (n = 4, σ = 29 %).

* σ = Standardabweichung

Zum Vergleich wurden auch Versuche mit radioaktivem ANF(99-126) durchgeführt. Zur Wiederfindung von ^{125}I-ANF (99-126) über C_{18}-Cartridges wurden 40000 CPM des Tracers in 3 ml 0.1 N HCl über je ein Cartridge gegeben. Jeder Probe wurden 5000 fmol unmarkiertes rat ANF(99-126) zugesetzt. Anschließend wurden die Cartridges mit TFA (0.1 %) gewaschen und mit Acetonitril (60 %) eluiert (siehe 4.3.1.). Die Wiederfindung von ^{125}I-ANF(99-126) im Acetonitril-Eluat betrug 79 % (n = 10, σ = 8 %); beim Beschicken der Cartridges wurden 11 % der Radioaktivität nicht retiniert (Tab. 5). Eine Elution mit 80 %, anstatt 60 % Acetonitril verbesserte die Ergebnisse nicht.

Tab. 5: Wiederfindungsraten [%] von ^{125}I-rat ANF(99-126) nach Vorreinigung über C_{18}-Cartridges.

Versuchs-abschnitte	Wiederfindungsrate von ^{125}I-ANF(99-126) [%]
Durchlauf	11
Waschen mit 0.1 % TFA	2
Eluieren mit 60 % Acetonitril	75

5.3. Versuche mit Atrien

5.3.1. Rattenatrien

Rattenatrien sind zum Studium von ANF-Peptiden besonders geeignet, da diese in ihnen in besonders hohen Konzentrationen nachgewiesen wurden (48). Es ist eines der bis

heute, im Hinblick auf ANF-Peptide, am besten untersuchten Gewebe (14,17,21,45,47). Die Aufklärung der Aminosäurensequenz von aus Rattenatrien isolierten ANF-Peptiden (45,46) ermöglichte es, synthetische Peptide herzustellen. Diese wiederum wurden zur Gewinnung von Antiseren gegen ANF-Peptide in Kaninchen eingesetzt und dienten als Standardsubstanzen bei radioimmunologischen Bestimmungen (61,62).

5.3.1.1. Extraktion

Um überprüfen zu können, ob bei der Extraktion von rat ANF(1-126) aus Herzvorhöfen Degradation zu rat ANF(99-126) auftritt, wurden Atriumextrakte nach verschiedenen Techniken hergestellt und diese nach Cartridge-Vorreinigung (siehe 4.3.1.) über Sephadex G-50 (siehe 4.9.) aufgetrennt. Zur Anwendung kam die HCl-Extraktion (siehe 4.2.1.) in verschiedenen Varianten (siehe Abb. 8a,b).

Die Ergebnisse der Versuche können nur qualitativ beurteilt werden, da die atrialen ANF(1-126)-Gewebsspiegel nach Vorreinigung (C_{18}-Cartridges) und gelchromatographischer Trennung (Sephadex G-50) nicht exakt ermittelt wurden, und zudem auch die Proteingehalte der Extrakte als Referenz nicht bestimmt wurden (siehe 5.3.1.5.).

Unter den Bedingungen der HCl-Extraktion konnte mit "Loisl II" ausschließlich ANF(1-126) detektiert werden (Abb. 8a). Durch den Einsatz von Enzymhemmern ist somit das Ergebnis der HCl-Extraktion offenbar nicht beein-

bar nicht beeinflußbar (Abb. 8a). Die Inaktivierung von ANF(1-126)-spaltenden Peptidasen durch den Einsatz von Säure und die Anwendung von Hitze scheint indessen notwendig. Sowohl bei der Durchführung der HCl-Extraktion ohne Erhitzen des Organs bzw. des Organhomogenats, als auch bei einer Extraktion eines Rattenatriums in PBS und sonst identischen Bedingungen wie bei der HCl-Extraktion trat neben ANF(1-126) auch Immunreaktion auf, die mit ANF (99-126) coeluierte (Abb. 8b).

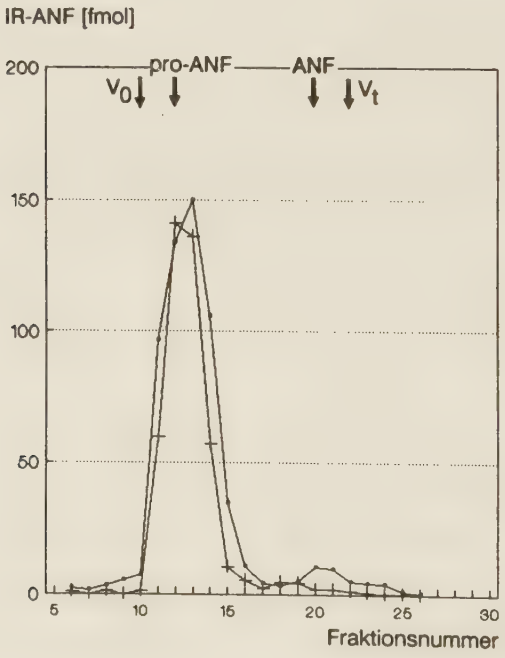


Abb. 8a: Analyse von Rattenatriumextrakten über Sephadex G-50: HCl-Extraktion (—•—) und HCl-Extraktion mit Anwendung von Enzymhemmern (—+—).

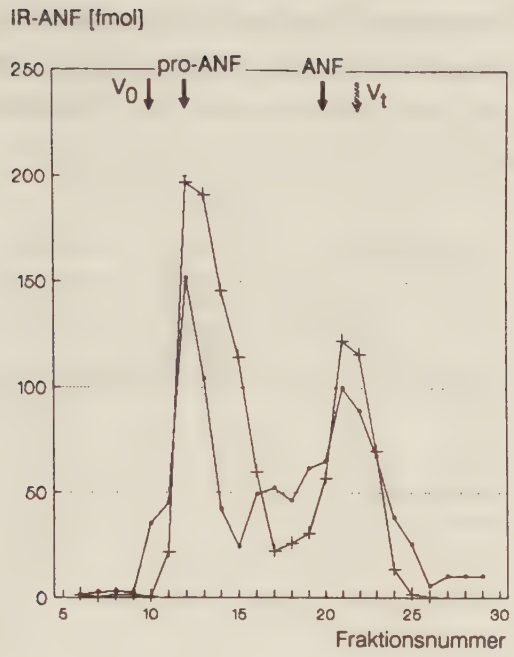


Abb. 8b: Analyse von Rattenatriumextrakten über Sephadex G-50: HCl-Extraktion ohne Anwendung von Hitze (—•—) und Extraktion in Puffer nach Schema der HCl-Extraktion (—|—).

5.3.1.2. Gelchromatographie

Die Wiederfindungsraten von rat ANF(99-126) und rat ANF (2-126) über Sephadex G-50 lagen im Bereich von 80 %. Die gelchromatographischen Trennungen von HCl-Extrakten (siehe 4.2.1.) aus Rattenatrien nach Vorreinigung über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.) zeigten Immunreaktion, die mit synthetischem rat ANF(2-126) coeluierte (Abb. 9). Bei einer 1:1000-Verdünnung des Extrakte lagen die Meßpunkte im linearen Bereich der RIA-Standardkurve. Im Hinblick

auf die angestrebte quantitative Bestimmung von ANF(1-126) in Vorhofgewebe, wurden Rattenatriumextrakte auch ohne Cartridge-Vorreinigung über Sephadex G-50-Säulen gegeben. Mit "Loisl II" wurde auch hier ANF(1-126) detektiert.

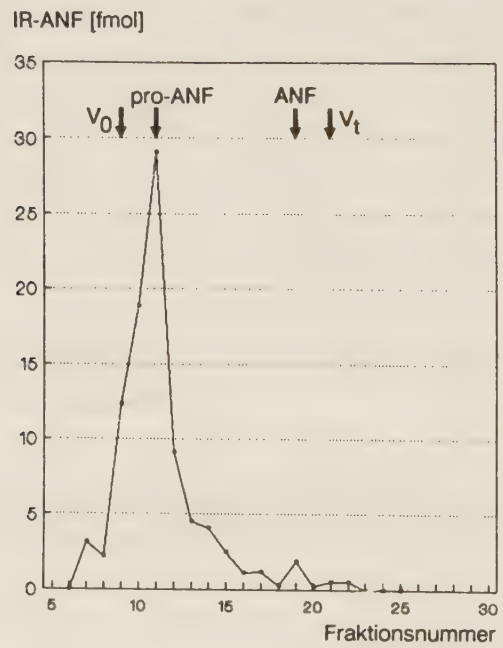


Abb. 9: Trennung eines Rattenatriumextrakts (1:1000-Verdünnung) über Sephadex G-50: Der Extrakt wurde über ein C_{18}-Cartridge vorgereinigt. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum "Loisl II".

5.3.1.3. HPLC

Die Wiederfindung von synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) bei der RP-Chromatographie und bei der HP-

GFC betrug etwa 90 %. Vor der RP-HPLC wurden Vorhofextrakte von Ratten auf Sephadex G-50-Säulen aufgetragen und Aliquots der Fraktionen im RIA gemessen. Anschließend wurden jeweils die immunreagierenden Fraktionen gepoolt, lyophilisiert und mit einem Acetonitril-Gradienten von 10 bis 80 % in 45 min analysiert (Abb. 10). Zur Detektion wurde das Antiserum "Loisl II" verwendet.

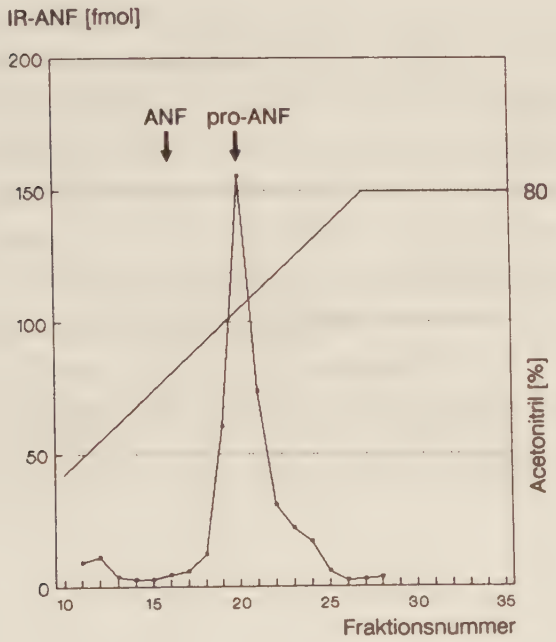


Abb. 10: RP-HPLC: Die Fraktionen 11 und 12 der Trennung über Sephadex G-50 (siehe Abb. 9) wurden gepoolt und mittels der Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm mit einem Acetonitril-Gradienten von 10 bis 80 % in 45 min analysiert. Die Detektion erfolgte mit "Loisl II".

5.3.1.4. in vitro-Metabolisierung von ANF(1-126)

In vivo wird ANF(99-126) durch eine membranassoziierte, spezifische Protease von ANF(1-126) abgespalten und gelangt zusammen mit dem N-terminalen Fragment ANF(1-98) in den Blutkreislauf (16). Diese Spaltung kann auch in vitro nachvollzogen werden (60).

Wie beschrieben (siehe 4.11.) wurde gelchromatographisch (Sephadex G-50) (siehe 4.9) gereinigtes ANF(1-126) aus HCl-Extrakten (siehe 4.2.1.) von Rattenatrien mit 3 µl Rattenserum 0, 5 und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abbruch der Reaktion mit 1 % TFA wurden die Proben lyophilisiert, in 50 µl 0.1 % TFA wiederaufgenommen und je 20 µl über RP-HPLC (Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden im RIA mit dem Antiserum "Toni III" detektiert (Abb. 11a,b,c). Das zur Detektion von ANF-Peptiden der Ratte besser geeignete Antiserum "Loisl" stand zum Versuchszeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

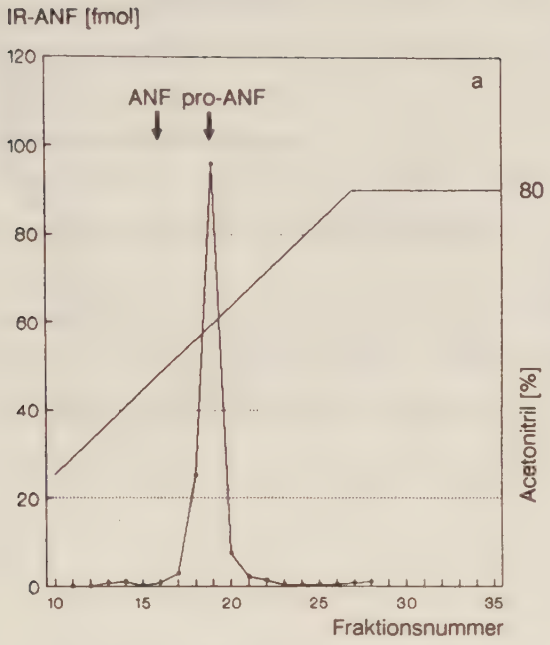
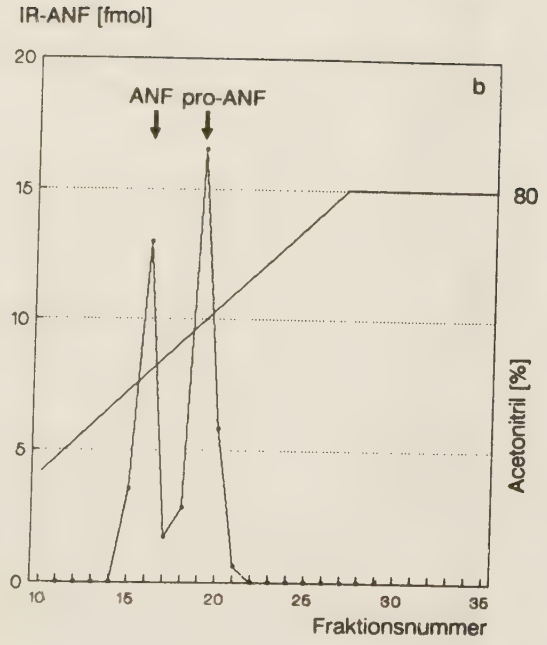


Abb. 11a: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 10-80 % in 45 min): Kontrolle zur Inkubation von rat ANF(1-126) mit Rattenserum. Zur Detektion wurde das Antiserum "Toni III" verwendet.



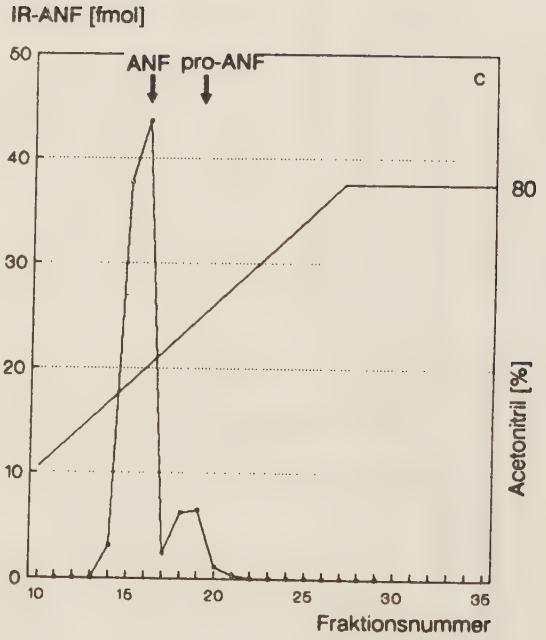


Abb. 11b,c: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min). Inkubation von rat ANF(1-126) mit Rattenserum für 5 min (b) bzw. 15 min (c). Die Detektion erfolgte mit "Toni III".

5.3.1.5. Quantifizierung

Kenntnisse über Gewebskonzentrationen von ANF-Peptiden sind für die Erforschung ihrer Funktionen notwendig. Zur Quantifizierung des ANF(1-126)-Gehalts von Rattenatrien (200 g schwere Ratten) wurden HCl-Extrakte (siehe 4.2.1.) (n = 8) angefertigt. Die Extrakte wurden ohne Vorreinigung lyophilisiert und in 0.1 M Essigsäure wiederaufgenommen. Verdünnungen von 1:10000, 1:20000 und 1:40000 wurden je Atrium in Doppelbestimmungen im RIA eingesetzt und mit "Loisl II" detektiert. Bezogen auf den Proteingehalt der Extrakte wurden in rechten Atrien 925 pmol ANF(1-126)/mg Protein (σ = 84 pmol) und in linken Atrien 570 pmol ANF(1-126)/mg Protein (σ = 61 pmol) gemessen.

5.3.1.6. biologische Aktivität von ANF-Peptiden

Neben der biochemischen Charakterisierung und Quantifizierung einer Substanz ist der Nachweis ihrer biologischen Wirksamkeit wünschenswert. Die relaxierende Wirkung von ANF(99-126) bzw. ANF(1-126) wurde an einem isolierten Kükenrektum getestet (siehe 4.12.). Verschiedene Konzentrationen von synthetischem rat ANF(99-126) und von aus Atrien isoliertem rat ANF(1-126) (Immunreaktion) wurden bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, die Carbachol-induzierte Kontraktion zu hemmen. In Abb. 12 ist die prozentuale Reduktion der Organkontraktion bedingt durch die ANF-Peptide angegeben.

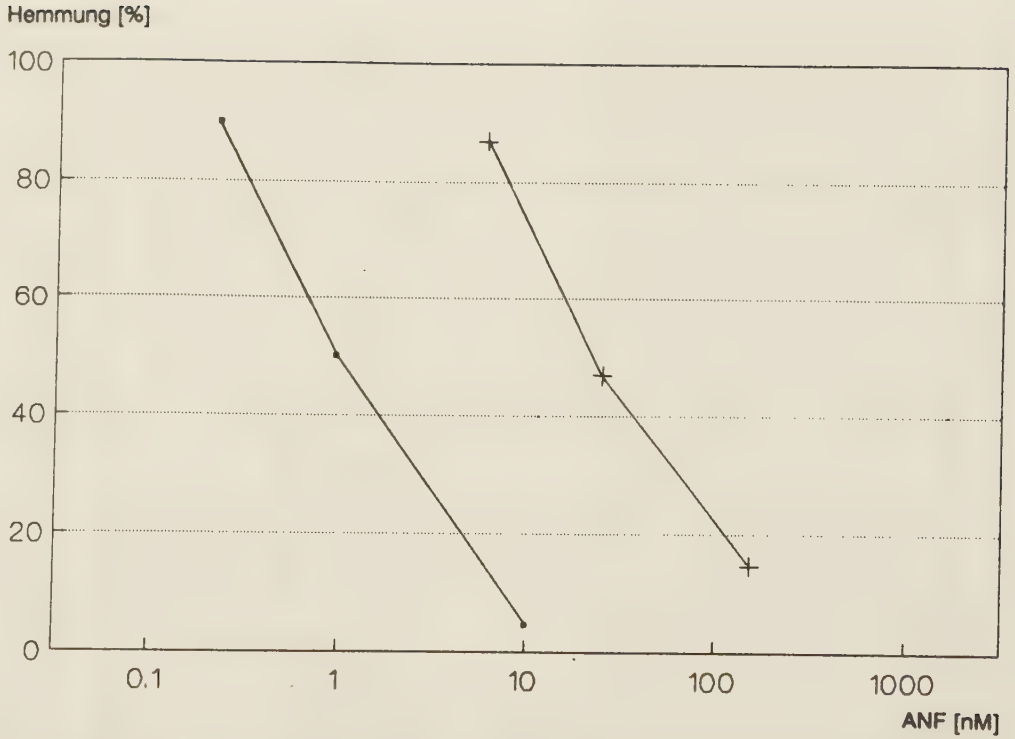


Abb. 12: Messung der muskelrelaxierenden Aktivität von synthetischem rat ANF(99-126) (—•—) und von rat ANF(1-126) (—┼—).

5.3.2. Atrien anderer Tierspezies

Innerhalb des Tierreichs herrscht bezüglich der Aminosäurensequenz Atrialer Natriuretischer Peptide anscheinend weitgehende Übereinstimmung (63). Dies erlaubte, ANF-Peptide verschiedener Spezies mit den zur Verfügung stehenden Antiseren zu detektieren, obwohl deren Aminosäurensequenzen zum Teil noch nicht bekannt sind.

HCl-Extrakte (siehe 4.2.1.) von je 1 g Vorhofgewebe eines Rindes bzw. Schweines wurden nach Vorreinigung über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.) gelchromatographisch (Sephadex G-50) (siehe 4.9.) (Abb. 13) und mittels RP-HPLC (Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min) (siehe 4.10.) analysiert. Neben Immunreaktion, die mit ANF(1-126) coeluierte, wurde mit "Toni III" auch ANF(99-126)-Immunreaktion detektiert. Die Aminosäurensequenz von Rinder- und Schweine-ANF ist identisch mit der des menschlichen ANF (64,65). Das gegen human ANF gerichtete Antiserum "Toni III" ist aus diesem Grund zur Detektion des ANF der Tierspezies Rind und Schwein geeignet.

Bei den Trennungen der vorgereinigten (C_{18}-Cartridges) HCl-Extrakte von beiden Atrien eines Eintagskükens konnte mit den Antiseren "Loisl II" und "Toni III" keine Immunreaktion gemessen werden. Der Antikörper "17/26" detektierte Immunreaktion im Bereich von ANF(1-126), es traten aber mehrere Peaks auf, die keiner der verwendeten Eichsubstanzen (siehe 4.9.) zugeordnet werden konnten (Abb. 14).

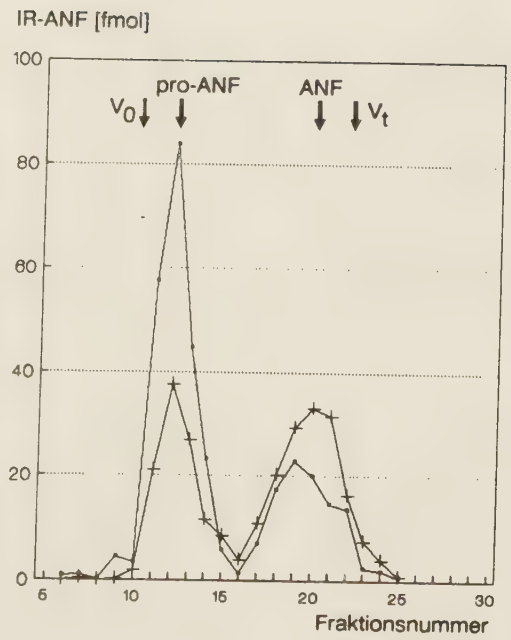


Abb. 13: Sephadex G-50: Vorgereinigte (C_{18}-Cartridges) Atriumextrakte vom Rind (—•—) und Schwein (—+—). Zur Detektion wurde "Toni III" verwendet.

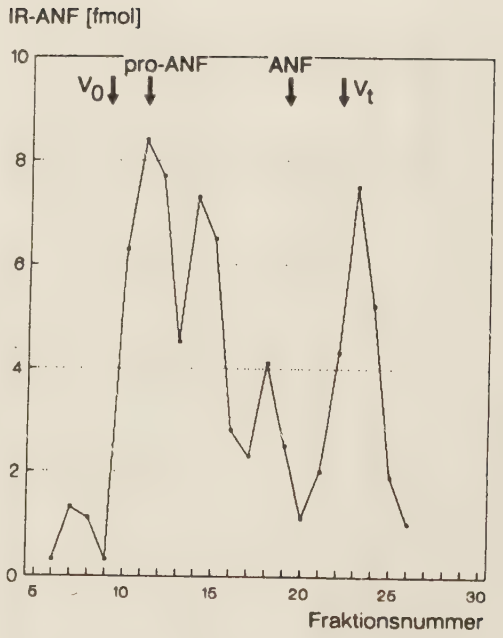


Abb. 14: Sephadex G-50: Atriumextrakt eines Eintagskükens nach Vorreinigung über ein C_{18}-Cartridge. Detektion mit "17/26".

5.4. Weitere Organe

5.4.1. Lunge

Von Ratten- und Meerschweinchenlungen wurden HCl-Extrakte (1 g Gewebe/10 ml 0.1 N HCl) (siehe 4.2.1.) angefertigt. SEP-PAK C_{18}-Cartridges dienten zur Vorreinigung (siehe 4.3.1.) der Extrakte. Mittels Gelchromatographie (Sephadex G-50) (Abschn. 4.9.) und RP-HPLC (Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min) (siehe 4.10.) konnte die gemessene Immunreaktion ANF(1-126) und ANF(99-126) zugeordnet werden (Abb. 15,16,17). Die Detektion im RIA erfolgte mit "Toni III". ANF(99-126)-Immunreaktion trat nur in einem Teil der Extrakte auf (Abb. 15).

Die Quantifizierung des Gehalts an ANF(1-126) in HCl-Extrakten von Rattenlungen (250 g schwere Ratten) ergab nach Vorreinigung über C_{18}-Cartridges und Trennung über Sephadex G-50 62 pmol ANF(1-126)/g Gewebe ($n = 3$, $\sigma = 8$ pmol). Zur Messung der Sephadex-Fraktionen im RIA wurde das Antiserum "Loisl II" eingesetzt.

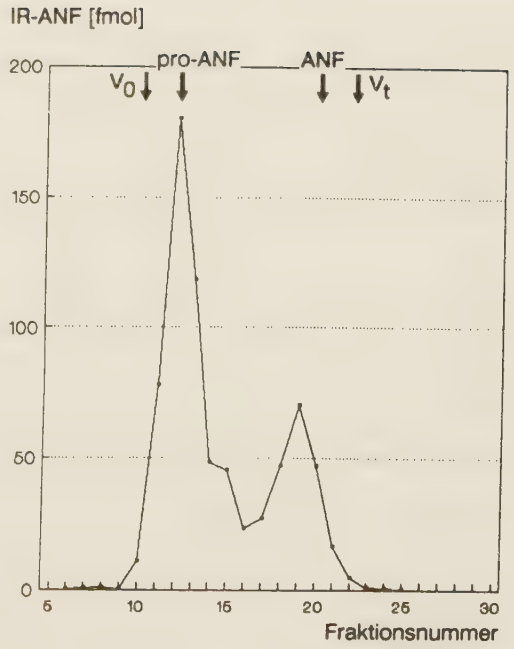


Abb. 15: Sephadex G-50: Lungenextrakt (HCl-Extraktion) einer Ratte nach Vorreinigung über ein C_{18}-Cartridge. Die Detektion erfolgte mit "Toni III".

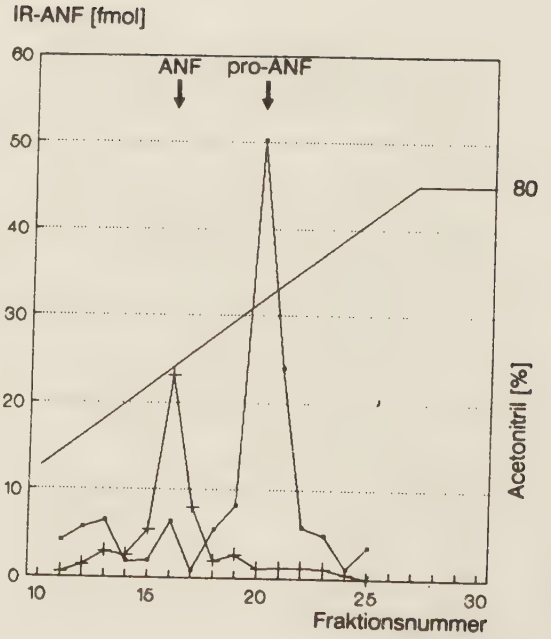


Abb. 16: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min): Lungenextrakt einer Ratte nach gelchromatographischer Trennung (siehe Abb. 15). Es wurden die Sephadex G-50-Fraktionen 11,12, 13 (—•—) und 18,19,20 (—+—) analysiert. Detektion mit "Toni III".

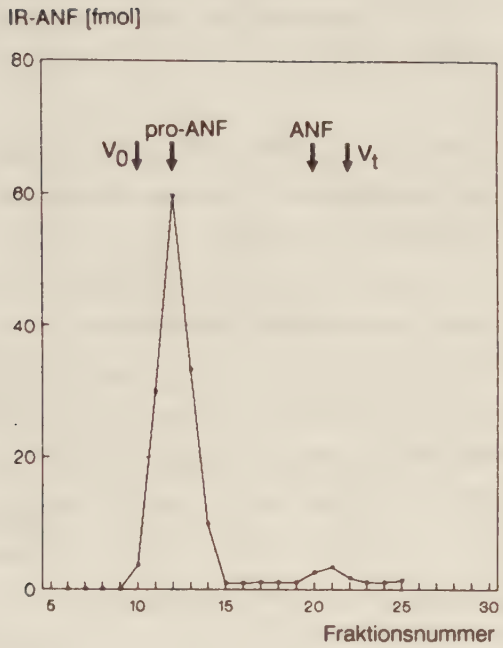


Abb. 17: Sephadex G-50-Analyse eines Lungenextrakts (HCl-Extraktion) vom Meerschweinchen nach Vorreinigung über ein C_{18}-Cartridge. Es wurde mit dem Antiserum "Toni III" detektiert.

5.4.2. Gehirn

Um orientierende Informationen über ANF-Peptide im Zentralnervensystem zu erhalten, wurden Rattengehirne gewonnen und analysiert.

Von frisch entnommenen Gehirnen wurden HCl-Extrakte (siehe 4.2.1.) angefertigt und über C_{18}-Cartidges (siehe 4.3.1.) gegeben. Die Sephadex G-50-Profile (siehe 4.9.)

der Extrakte zeigten einen Peak im Bereich des Molekulargewichts von ANF(1-126), ein zweiter Peak coeluierte mit ANF(99-126) (Abb. 18).

Die immunreagierenden Fraktionen [Elutionsbereich von ANF(1-126): Fraktionen 9,10,11; Elutionsbereich von ANF (99-126): Fraktionen 16,17,18] wurden gepoolt und getrennt über RP-HPLC (Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min) (siehe 4.10) analysiert (Abb. 19). Die Elutionsposition der Fraktionen 9,10,11 stimmte mit derjenigen von synthetischem rat ANF(2-126) überein. Die Analyse der niedermolekularen Fraktionen 18,19,20 ergab einen Peak, der mit ANF(103-126) coeluierte. Zur Detektion wurde das Antiserum "Toni III" verwendet. "Toni III" erkennt rat ANF(1-126) zu 27 %, rat ANF(103-126) nur zu 13 %. Die Höhe der Peaks läßt weder eine korrekte Aussage über die tatsächlich vorliegenden Mengen an ANF-Peptide, noch über deren Mengenverhältnis zueinander zu.

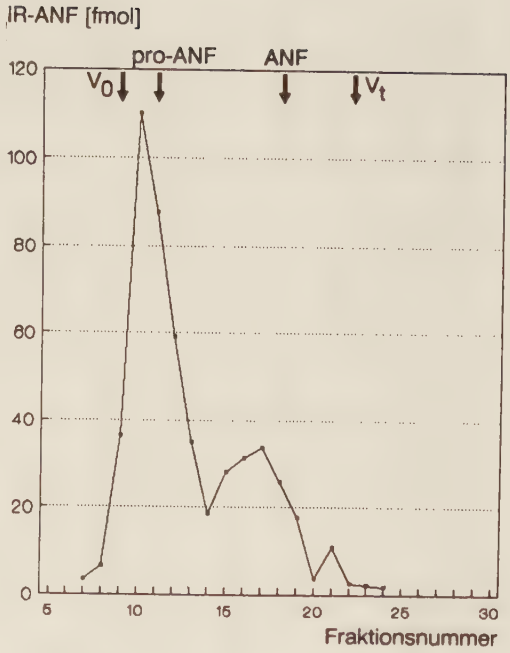


Abb. 18: Sephadex G-50: HCl-Extrakt eines Rattengehirns nach Vorreinigung über ein C_{18}-Cartridge. Zur Detektion wurde "Toni III" verwendet.

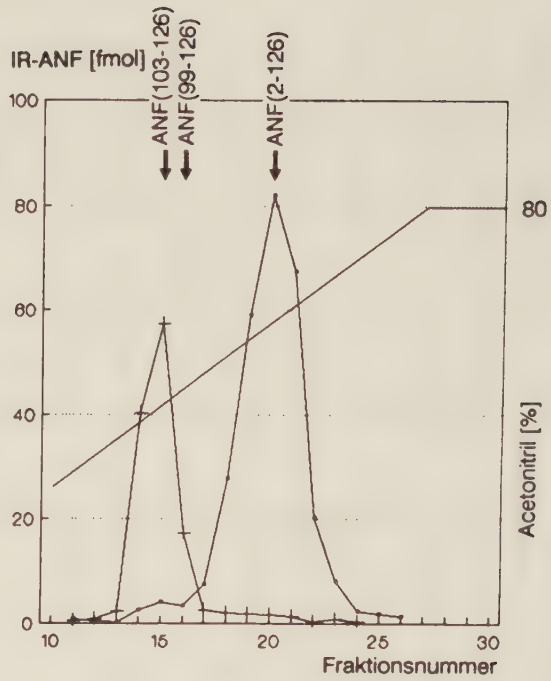


Abb.19: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 10 bis 80 % in 45 min): Gehirnextrakt einer Ratte nach gelchromatographischer Trennung (siehe Abb. 18). Die Sephadex G-50-Fraktionen 9,10,11 (—•—) und 16,17,18 (—+—) wurden gepoolt und getrennt analysiert. Detektion mit "Toni III".

5.4.4. Speicheldrüsen

Aus den Glandd. mandibulares von Meerschweinchen wurden HCl-Extrakte (siehe 4.2.1.) angefertigt und diese über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.) vorgereinigt. Entgegen der bei anderen Organen (Lunge, Gehirn) angewendeten Trennung der Extrakte über Sephadex G-50 (siehe 4.9.) konnte bei Speicheldrüsen- und Pankreasextrakten auf diesen Reinigungsschritt verzichtet werden. Der Trocknungsrückstand von Extrakten der Glandd. mandibulares löste sich gut in 60 µl 0.1 % TFA und konnte direkt mittels HPLC (siehe 4.10.) analysiert werden. Es wurden 20 µl über die Säule Spherogel TKS gegeben. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper "Toni III". Die ANF-Immunreaktion eluierte in derselben Position wie synthetisches rat ANF(99-126) (Abb. 20).

Zur Detektion Atrialer Natriuretischer Peptide in Organextrakten von Meerschweinchen wurde das Antiserum "Toni III" verwendet. Zwar ist die Aminosäurensequenz des Meerschweinchen-ANF(1-126) bisher nicht bekannt, es konnten jedoch bei Bestimmungen mit "Toni" im Vergleich zu "Loisl" größere Mengen ANF(1-126)- bzw. ANF(99-126)-Immunreaktion gemessen werden (siehe Abb. 28). Man kann annehmen, daß das Antiserum "Toni" mit Meerschweinchen-ANF besser kreuzreagiert als "Loisl" und daher zur Detektion der ANF-Peptide dieser Spezies auch besser geeignet ist.

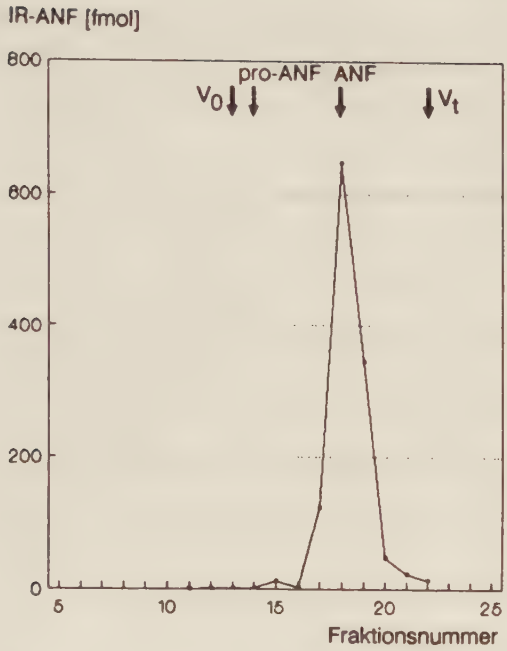


Abb. 20: HP-GFC (Säule Spherogel TSK 7.5 mm x 300 mm): Analyse eines vorgereinigten (C_{18}-Cartridge) HCl-Extrakts der Glandd. mandibulares vom Meerschweinchen. Die Detektion erfolgte mit "Toni III".

5.4.4. Pankreas

Pankreasgewebe von Meerschweinchen wurde einer HCl-Extraktion unterzogen (siehe 4.2.1.) und die Extrakte über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.) gegeben. Die lyophilisierten Eluate wurden in 100 µl 0.1 % TFA aufgenommen und von je 20 µl ein HPLC-Lauf mit der C_{18}-Säule 2 mm x 150 mm (Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min) und der TSK-Säule angefertigt (Abb. 21,22). Die Analyse mittels zweier Säulen, die nach unterschiedlichen Trennprinzipien (C_{18}-Säule: Trennung nach Polarität, TSK-Säule: Trennung nach Molekulargewicht) arbeiten, sollte das Ergebnis entsprechend absichern. Bei beiden Trennungen coeluierte die Immunreaktion mit synthetischem rat ANF(99-126). Die Detektion der HPLC-Fraktionen erfolgte im RIA mit dem Antiserum "Toni III".

Mit synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) wurden Wiederfindungsversuche (siehe 4.2.7.) durchgeführt. Nach der gelchromatographischen Trennung über Sephadex G-50 (siehe 4.9.) konnten von dem eingesetzten ANF(99-126) 34 % von ANF(2-126) dagegen nur 1 % wiederentdeckt werden.

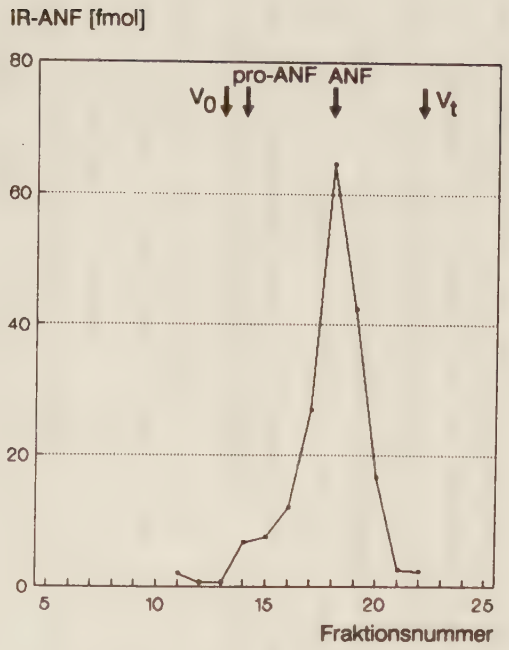


Abb. 22: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonotril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min): Vorgereinigter (C_{18}-Cartridge) HCl-Extrakt eines Meerschweinchenpankreas. Zur Detektion wurde "Toni III" verwendet.

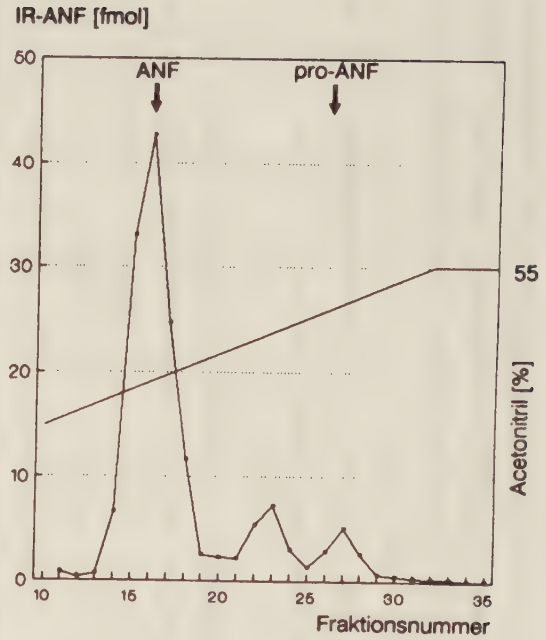


Abb. 21: HP-GFC (Säule Spherogel TSK 7.5 mm x 300 mm): Vorgereinigter (C_{18}-Cartridge) HCl-Extrakt eines Meerschweinchenpankreas. Zur Detektion wurde "Toni III" verwendet.

5.4.5. Gastrointestinaltrakt

Durch die intestinale Flüssigkeits- und Elektrolytabsorption trägt der Verdauungstrakt in bedeutender Weise zur Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolytgleichgewichts im Organismus bei. Eine Funktion Atrialer Natriuretischer Peptide im Gastrointestinaltrakt kann aus diesem Grund vermutet werden.

Zur Untersuchung von ANF-Peptiden gelangten Magen, Jejunum, Caecum und Colon von Meerschweinchen (600 g). HCl-Extrakte (siehe 4.2.1.) dieser Organe (1 g Gewebe/10 ml 0.1 N HCl) wurden über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.) gegeben. In jedem der untersuchten Darmabschnitte betrug die mit dem Antiserum "Toni III" nach der gelchromatographischen Trennung (Sephadex G-50) (siehe 4.9.) gemessene ANF(1-126)-Menge etwa 7.5 pmol/g Gewebe. In Extrakten des Magens konnte keine Immunreaktion detektiert werden. Die Immunreaktion der Darmextrakte eluierte an derselben Stelle wie synthetisches rat ANF(2-126) (Abb. 23,24). Die chromatographischen Analysen (Sephadex G-50) von Jejunum- und Colonextrakten zeigten gelegentlich einen zweigipfeligen Peak (Abb. 24). Die erste Spitze konnte ANF(1-126) zugeordnet werden, die zweite trat in den Fraktionen 14,15,16 auf. Die Fraktionen dieses "Zwischenpeaks" wurden gepoolt und mittels HP-GPC (siehe 4.10.) (Abb. 25) und RP-HPLC analysiert. Die Messung von ANF-Peptiden in Darmextrakten erfolgte mit dem Antikörper "Toni III". Das mittels Gelchromatographie (Sephadex G-50) und HPLC (RP-HPLC und HP-GPC) (Abb. 26,27) unter-

suchte Material wurde als ANF(1-126) identifiziert. Es wurde auch von den Antikörpern "Loisl II", "17/26" und "GT-23" als Immunreaktion in der Elutionsposition von synthetischem rat ANF(2-126) erkannt (Abb. 28,29).

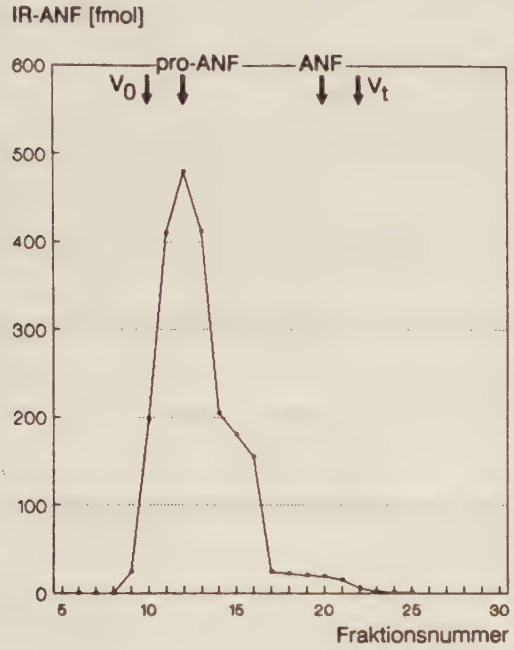


Abb. 23: Sephadex G-50: Trennung eines vorgereinigten (C_{18}-Cartridge) Meerschweinchencolons (HCl-Extraktion). Es wurde mit "Toni III" detektiert.

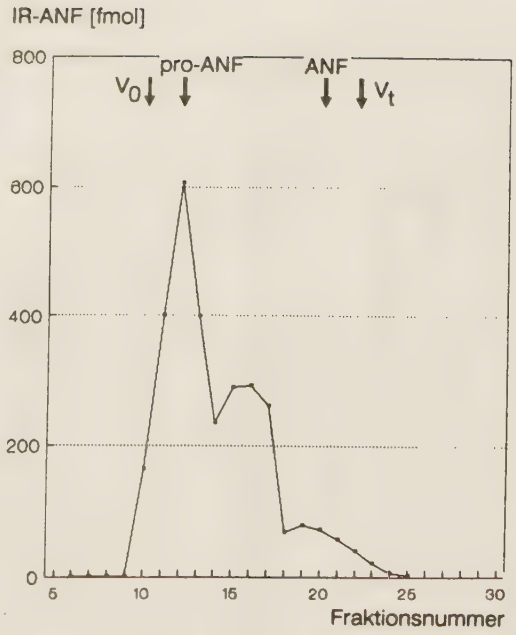


Abb. 24: Sephadex G-50: Trennung eines vorgereinigten (C_{18}-Cartridge) Meerschweinchenjejunums (HCl-Extraktion). Zur Detektion wurde "Toni III" verwendet.

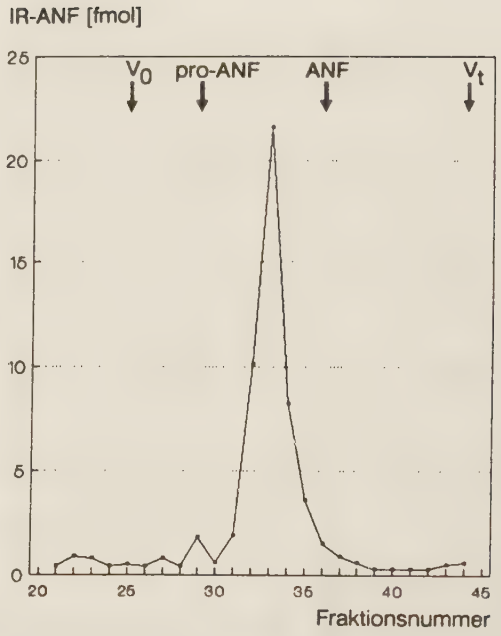


Abb. 25: Analyse der immunreagierenden Sephadex G-50-Fraktionen 14,15,16 eines Colonextrakts mittels HP-GFC (Säule Spherogel TSK 7.5 mm x 300 mm). Es wurde eine Flußrate von 0.3 ml/min gewählt. Detektion mit "Toni III".

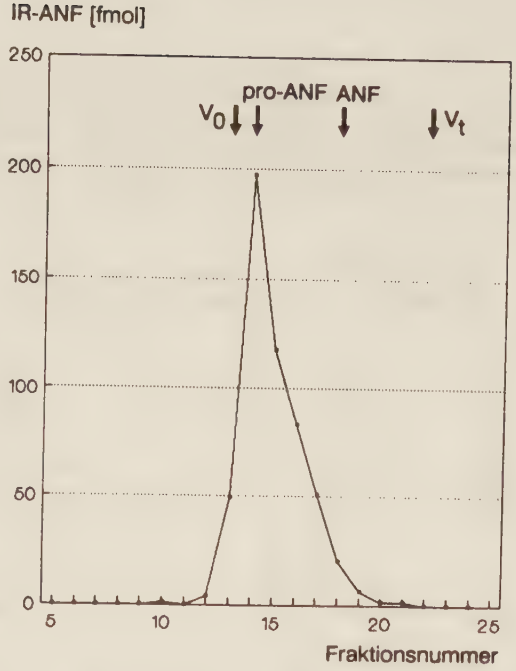


Abb. 26: HP-GFC-Analyse (Säule Spherogel TSK 7.5 mm x 300 mm) der Fraktionen 11,12,13 (Aliquots) der gelchromatographischen Trennung eines Colonextrakts (siehe Abb. 23). Detektion mit "Toni III".

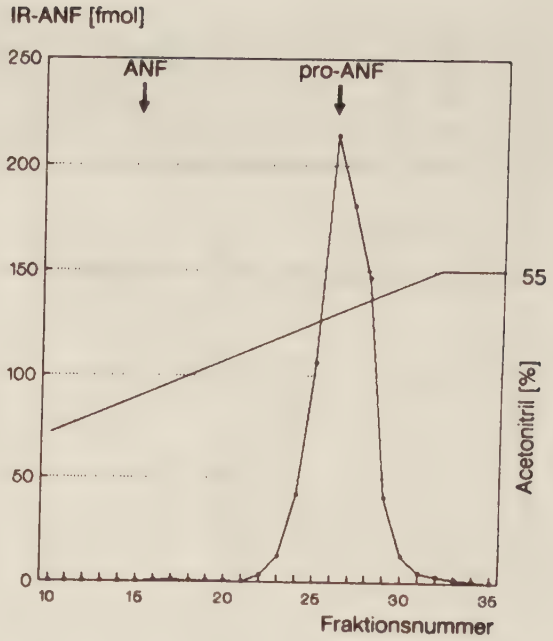


Abb. 27: RP-HPLC-Analyse (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min) der Fraktionen 11,12,13 (Aliquots) der gelchromatographischen Trennung eines Colonextrakts (siehe Abb. 23). Detektion mit "Toni III".

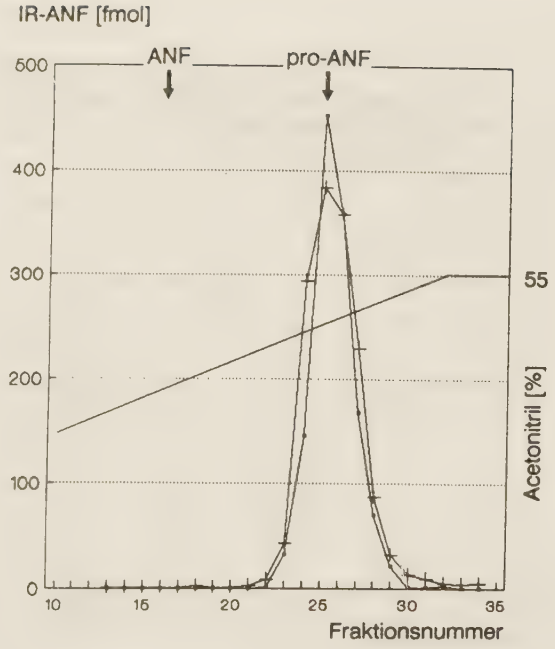


Abb. 28: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min): Aliqots der Sephadex G-50-Fraktionen 11,12,13 eines Colonextrakts (siehe Abb. 23) wurde mit den Antiseren "Toni III" (—•—) und "Loisl II" (—+—) detektiert.

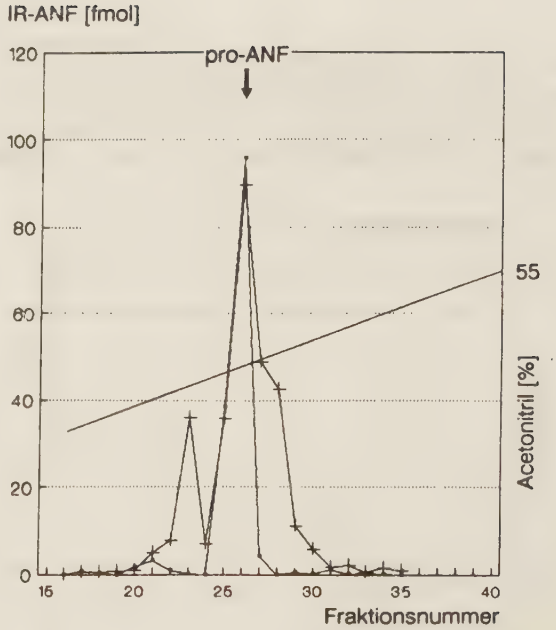


Abb. 29: Die immunreagierenden Fraktionen der Trennung eines Colonextrakts über Sephadex G-50 wurden gepoolt und mittels RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 4.6 mm x 250 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min) analysiert. Die Detektion erfolgte mit den Antiseren "GT-23" (—•—) und "17/26" (—+—).

Bezüglich des Herzens wird in vivo vor der Sekretion in die Blutbahn durch eine membrangebundene Protease ANF(99-126) von ANF(1-126) abgespalten (16,17). In vitro kann diese Spaltung durch Inkubation ANF(1-126) mit Serum erreicht werden (60).

Im in vitro-Experiment (siehe 4.11.) wurde demonstriert, daß die aus Darmextrakten (Meerschweinchencolon) isolierte und als ANF(1-126) identifizierte Immunreaktion durch Inkubation mit 5 µl Überstand von gepuffertem Colonhomogenat gleichfalls zu ANF(99-126) gespalten wird. Die RP-HPLC-Trennungen (Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min) (siehe 4.10.) der Proben zeigten, daß bereits nach 1 min 60 % des Vorläufers zu ANF(99-126) gespalten war (Abb. 30b). Nach 5 min konnten nur noch 2 % der Immunreaktion als ANF(1-126) identifiziert werden (Abb. 30b).

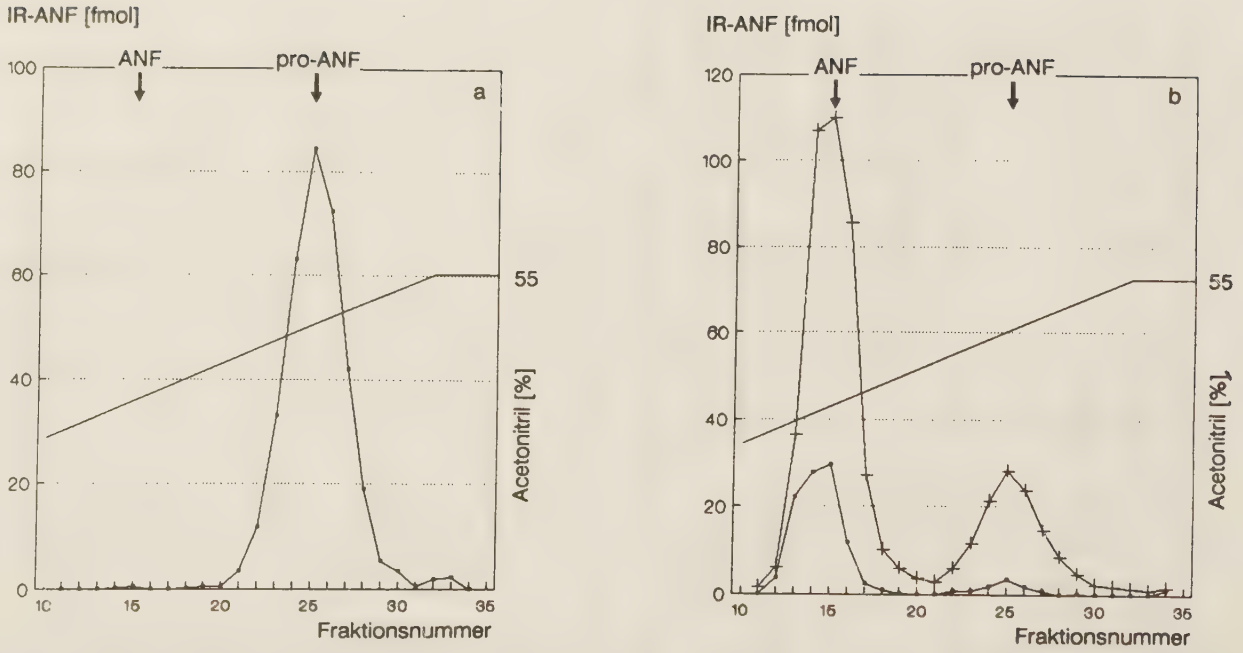


Abb. 30a,b: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min). a: Kontrolle zur Inkubation von ANF(1-126) aus Colonextrakt mit gepuffertem Überstand aus Colonhomogenat; b: Inkubation von ANF(1-126) aus Colonextrakt mit gepuffertem Colonhomogenat für 1 min (-+-) bzw. 5 min(-•-).

Die im Darm gemessenen Konzentrationen von ANF(1-126) variierten erheblich. In parallelen Ansätzen wurden gleich große (0.5 g) Gewebsmengen (Anfangsabschnitt von Colon ascendens) unter identischen Bedingungen aufgearbeitet. Trotzdem konnte nur in etwa 10 % der HCl-Extrakte, die vorgereinigt (C_{18}-Cartridges) anschließend gelchromatographiert (Sephadex G-50) wurden, überhaupt ANF(1-126) identifiziert werden. In den positiven Proben betrugen die mit "Toni III" gemessenen Quantitäten bis 18.5 pmol/g Gewebe.

Eine Ursache dieser Ergebnisse könnte durch Verluste an ANF-Peptiden bei Extraktion und Vorreinigung der Gewebe bedingt sein. Um dies näher zu studieren, wurden Versuche zur Wiederfindung von synthetischem ANF(2-126) und ANF (99-126) durchgeführt.

In Abwesenheit von Gewebe wurden 5000 fmol synthetisches ANF(2-126) in 5 ml 0.1 N HCl extrahiert, der Extrakt über ein C_{18}-Cartridge gegeben und der Trocknungsrückstand des Acetonitril-Eluats gelchromatographiert. Die Messung der Sephadex G-50-Fraktionen im RIA mit dem Antiserum "Toni III" ergab eine Wiederfindungsrate von 80.5 %.

In Wiederfindungsversuchen (n = 6) von ^{125}I-rat ANF(99-126) wurden 40000 CPM des Tracers und 5000 fmol rat ANF(99-126) zusammen mit 0.5 g Meerschweinchencolon in 5 ml 0.1 N HCl extrahiert und die Radioaktivität im Über-

stand gemessen. Es konnten mehr als 80 % (σ = 3 %) des Tracers wiederentdeckt werden.

Wurden Wiederfindungsversuche (n = 5) (Abschn. 4.2.7.) von synthetischem rat ANF(2-126) (5000 fmol) in Anwesenheit von kleinen Gewebsmengen (0.5 g Meerschweinchencolon/5 ml 0.1 N HCl) durchgeführt, betrug der nach salzsaurer Extraktion Cartridge-Vorreinigung und gelchromatographischer Trennung (Sephadex G-50) im RIA (Antiserum "Toni III") wiedergefundene Anteil lediglich 14 %. Das dem Organhomogenat zugesetzte ANF(1-126) wurde aus Rattenatrien durch HCl-Extraktion gewonnen und im RIA mit dem Antiserum "Toni III" quantifiziert (siehe 5.3.1.5.).

Zur Verbesserung der Wiederfindung von ANF(1-126) aus Darmgewebe wurden unter verschiedenen Bedingungen salzsaure Extraktionen durchgeführt. Die Messung der Immunreaktionen im RIA erfolgte nach Cartridge-Vorreinigung und Trennung über Sephadex G-50 mit dem Antiserum "Toni III". Es wurden jeweils 0.5 g Meerschweinchencolon (Colon ascendens)/5 ml 0.1 N HCl aufgearbeitet.

Zum Waschen und Präparieren des Colons wurde der Waschlösung (physiologische NaCl-Lösung) zur Hemmung von gewebseigenen Proteasen PMSF (10^{-5} M), EDTA (0.1 %) und Pepstatin A (5 x 10^{-6} M) zugesetzt. Das Extraktionsmittel (0.1 N HCl) enthielt ebenfalls PMSF (10^{-5} M) und EDTA (0.1 %) (siehe 4.2.5.). Im Ergebnis zeigte sich, daß die Wiederfindung des endogenen ANF(1-126) gegenüber der HCl-

Extraktion ohne Zusatz von Enzymhemmern nicht verbessert werden konnte.

Um einer post mortem einsetzenden Spaltung von endogenem ANF(1-126) vorzubeugen, wurden in einem weiteren Versuch die benötigten Darmteile sofort nach dem Töten der Meerschweinchen in Bouinscher Lösung (66) für 3 h fixiert. Die anschließende Aufarbeitung verbesserte nicht die Wiederfindungsrate an endogenem ANF(1-126).

Um einen möglichst vollständigen Aufschluß der ANF(1-126)-speichernden Zellen bei der Extraktion sicherzustellen, wurden die Colonhomogenate vor der Zentrifugation (siehe 4.2.1.) zusätzlich einer Ultraschallbehandlung unterzogen bzw. die Zellen durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen lysiert. Eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Ausbeuten an ANF(1-126) wurde auch hierbei nicht erzielt.

Versuche zur Wiederfindung von synthetischem ANF(2-126) wurden in Gegenwart von 2 M NaCl, 6 M Harnstoff, 0.2 % Triton X-100 oder 1 % SDS (siehe 4.2.6.) bei der Extraktion von Colon durchgeführt. Hochmolare Salzlösungen und Detergentien, wie z.B. Triton X-100 und SDS, sind geeignet, unspezifische Adsorption von Peptiden und Proteinen an Oberflächen oder die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu unterbinden. Von der eingesetzten Menge ANF(2-126) (5000 fmol) konnte nach Trennung über Sephadex G-50 nur etwa 10 % wiedergefunden werden.

Die Detektion erfolgte im RIA mit dem Antiserum "Toni III".

Zur Extraktion von ANF(1-126) aus Meerschweinchencolon wurde auch die Essigsäure-Extraktion (siehe 4.2.2.) angewendet. Jeweils 1 g Gewebe wurde in 10 ml 2 M Essigsäure extrahiert. Die Extrakte wurden über C_{18}-Cartridges und Sephadex G-50 gereinigt und Aliquots der Sephadex G-50-Fraktionen im RIA detektiert. Die Anwendung dieser Technik erbrachte keine Verbesserung bezüglich der Reproduzierbarkeit der ANF(1-126)-Konzentrationen.

Die HCl-Aceton-Technik (siehe 4.2.3.) wurde ebenfalls zur Peptidextraktion angewendet. Es wurden 10 g Meerschweinchencolon in 30 ml Aceton-HCl-Gemisch extrahiert. Diese Methode erwies sich zur Extraktion von ANF-Peptiden aus Geweben grundsätzlich geeignet. So konnten nach Extraktion der Atrien einer Ratte (250 g) in 5 ml Aceton-HCl-Gemisch und Trennung über Sephadex G-50 beträchtliche Mengen ANF(1-126) im RIA detektiert werden. Große Verluste an Immunreaktion traten allerdings beim Abfiltrieren des Präzipitats auf. Bei Anwendung der HCl-Aceton-Technik für die Extraktion von Meerschweinchencolon zeigten sich auch hier erhebliche Streuungen im Nachweis von ANF(1-126).

Bei der HCl-Heptan-Extraktion (siehe 4.2.4.) wurde 1 g Colon in 5 ml 0.1 N HCl extrahiert, der Organüberstand mit 5 Volumeneinheiten Heptan partiell entfettet und über

C_{18}-Cartridges gegeben. Es ist anzunehmen, daß fetthaltige HCl-Extrakte die Vorreinigung über C_{18}-Cartridges stören, indem sie deren Bindungsfähigkeit modifizieren. Auch bei Anwendung dieser Technik konnten in den Fraktionen der Sephadex G-50-Trennungen keine verbesserten Wiederfindungswerte für ANF(1-126) erreicht werden.

Um die Verluste an ANF(1-126) bei der Vorreinigung von Darmextrakten über C_{18}-Cartridges bestimmen zu können, wurde Colonextrakten (0.5 g Gewebe/5 ml 0.1 N HCl) synthetisches rat ANF(2-126) (500 fmol) zugesetzt und diese über C_{18}-Cartridges gegeben (n = 4). Zuvor war endogen in den Extrakten vorhandenes ANF(1-126) durch Inkubation (1 h, 37°C) des Organhomogenats in PBS abgebaut worden (siehe 4.2.7.). In einem Aliquot des Extrakts, dem kein ANF(2-126) zugesetzt war, ließ sich ANF(1-126) im RIA nicht nachweisen. Nach Trennung der Cartridge-Eluate über Sephadex G-50 erfolgte die Messung der Immunreaktion im RIA mit "Toni III". Die Ausbeute an ANF(2-126) betrug 63 % (σ = 26 %).

Zur Isolation von ANF(99-126) aus Serum wurde in der Literatur die Verwendung von Adsorberharz beschrieben (55). In Tab. 6 wird die Wiederfindung von ^{125}I-ANF(99-126) aus Colon- und Milzhomogenaten (siehe 4.3.2.) nach Verwendung des Adsorberharzes XAD-4 wiedergegeben. XAD-4 wurde im "Batch"- und im "Säulen"-Verfahren getestet (siehe 4.3.2.) und mit C_{18}-Cartridges verglichen. Es wurde jeweils 1 g Gewebe zusammen mit 40000 CPM [plus

5000 fmol rat ANF(99-126)] extrahiert und über XAD-4 bzw. C_{18}-Cartridges vorgereinigt.

27 % des ^{125}I-ANF(99-126) in den Organüberständen wurde beim Beschicken der C18-Cartridges nicht retiniert. Beim "Säulen"-Verfahren mit XAD-4 wurden nur 8 % der aufgetragenen Radioaktivität nicht in dem Adsorberharz zurückgehalten. Im "Batch"-Verfahren waren es 15 %, die nicht gebunden wurden.

Tab. 6: Wiederfindungsrate [%] von ^{125}I-ANF(99-126) im Acetonitril-Eluat nach HCl-Extraktion und Vorreinigung von Colon- bzw. Milzhomogenaten über C_{18}-Cartridges und XAD-4 ("Säulen" und"Batch").

	Wiederfindungsrate von ^{125}I-ANF(99-126) [%]		
	XAD-4 Adsorberharz		C_{18}-Cartridges
	"Batch"	"Säulen"	
	57	72	48
σ [%]	4	1.5	2.5

In einem weiteren Versuch wurde die Effizienz der C_{18}-Cartridges in Bezug auf die Anreicherung von ANF(1-126) aus Organextrakten mit dem Adsorberharz XAD-4 und dem Kationenaustauscher SP Sephadex C-25 (siehe 4.3.3.) verglichen (Tab. 7). Mit dem Ionenaustauscher sollte ein weiteres Analysenprinzip mit dem Ziel eingesetzt werden, die Abtrennung Atrialer Natriuretischer Peptide zu ver-

bessern. Es wurden jeweils etwa 1000 fmol rat ANF(1-126) in 2.5 ml Colonextrakt über die C18-Cartridges, XAD-4- bzw. SP Sephadex C-25-Säulen gegeben. Rat ANF(1-126) wurde aus Rattenatrien durch HCl-Extraktion gewonnen und nach Trennung über Sephadex G-50 im RIA (Antiserum "Loisl II") quantifiziert. Die Acetonitril-Eluate von den Cartridges und XAD-4-Säulen und die Pyridin-Eluate von den SP Sephadex C-25-Säulen wurden im Speed-Vac eingeengt und anschließend gelchromatographiert (Sephadex G-50). Die Detektion erfolgte im RIA mit dem Antiserum "Loisl II".

Tab. 7 : Wiederfindungsrate [fmol] von 1000 fmol rat ANF (1-126) aus Colonextrakten nach Vorreinigung über C_{18}-Cartridges, XAD-4- und SP Sephadex C-25-Säulchen und gelchromatographischer Analyse.

Versuch	Vorreinigungsmethode		
	C_{18}-Cartridge	XAD-4	SP Sephadex C-25
1	193	419	272
2	136	327	223
3	58	249	116
4	69	299	130
5	--*	303	9
6	847	--*	200
7	221	248	117
8	203	348	98
9	198	29	222
10	194	255	105
x [fmol]	235	275	149
σ [fmol]	223	101	74

* verworfen

In Wiederfindungsversuchen (n = 3) mit synthetischem rat ANF(2-126) wurde gezeigt, daß Membranfilter (Centricon 30) grundsätzlich zur Vorreinigung von Organextrakten verwendet werden können. Die Methode erwies sich jedoch als sehr arbeitsaufwendig und teuer.

Colonextrakten (0.5 g Gewebe/5 ml 0.1 N HCl), in denen endogenes ANF(1-126) durch Inkubation bei 37°C (siehe 4.2.7.) abgebaut war, wurden 5000 fmol ANF(2-126) zugesetzt und je 1 ml Extrakt ultrafiltriert (Centricon 30) (siehe 4.3.4.) gegeben. Die Membranfilter wurden bei 5000 x g zentrifugiert, die Ultrafiltrate je eines Extrakts gepoolt und im Speed-Vac lyophilisiert. Nach Trennung über Sephadex G-50 wurde in zwei Versuchen mit dem Antiserum "Toni III" eine Ausbeute von 57 und 72 % gemessen, ein weiterer Ansatz mußte verworfen werden, da die Membranfilter verstopft wurden.

5.2.6. Milz

Milz von Meerschweinchen wurde ebenfalls auf ANF-Peptide untersucht, da eine Funktion in der Immunabwehr des Organismus vermutet wurde (67). Jeweils ein Organ eines Meerschweinchens (0.5 bis 1 g) wurde in 10 ml 0.1 N HCl extrahiert (siehe 4.2.1.), gefolgt von einer Voreinigung über C_{18}-Cartridges (siehe 4.3.1.). Die im Speed-Vac eingeengten Acetonitril-Eluate wurden über Sephadex G-50 (siehe 4.9.) fraktioniert und Aliquots im RIA mit "Toni III" detektiert (Abb. 31). Die ANF(1-126)-positiven Fraktionen des Sephadex-Laufs wurden gepoolt, lyophilisiert und mittels RP-HPLC analysiert (Abb. 32).

Ähnlich wie bei Extrakten von Meerschweinchendarm trat bei der Gelchromatographie (Sephadex G-50) von Milzextrakten gelegentlich immunreagierendes Material mit einer längeren Retentionszeit als ANF(1-126), aber einer kürzeren als ANF(99-126) auf (Abb. 31). Diese Immunreaktion konnte nicht identifiziert werden.

Versuche mit 5000 fmol synthetischem rat ANF(99-126) (siehe 4.2.7.) ergaben eine Wiederfindung von 73 % (n = 2). Die Ergebnisse mit synthetischem rat ANF(2-126) lagen bei nur 11 % (n = 4).

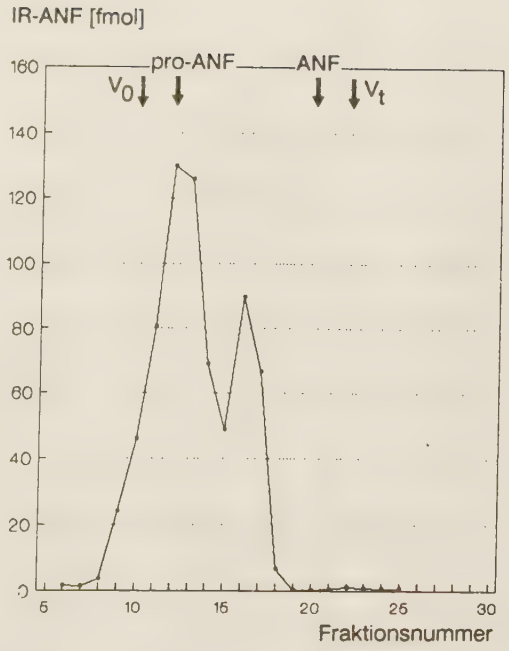


Abb. 31: Sephadex G-50: HCl-Extrakt einer Meerschweinchenmilz nach Vorreinigung über ein C_{18}-Cartridge. Detektion mit "Toni III".

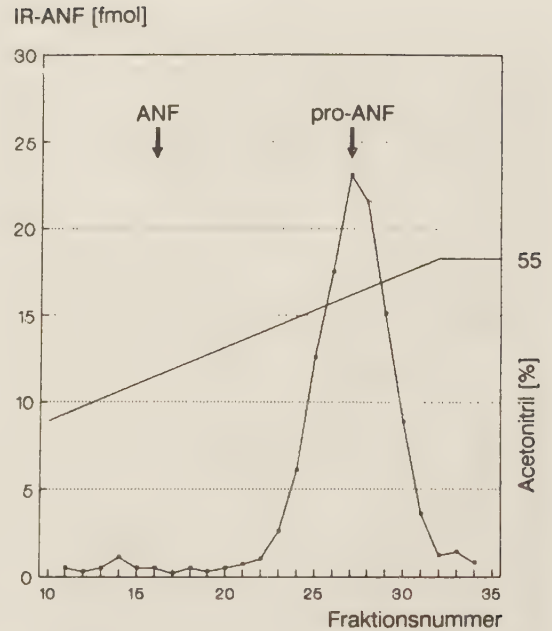


Abb. 32: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min). Die Fraktionen 11 und 12 der Trennung über Sephadex G-50 (siehe Abb. 31) wurden gepoolt und weiter analysiert. Detektion mit "Toni III".

5.4.7. Testes

Für isolierte Leydig-Zellen der Maus ist ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ANF(99-126)-Rezeptoren und der Produktion von Testosteron nachgewiesen (68). Ein Vorkommen von ANF-Peptiden in diesem Gewebe läßt sich vermuten.

Zur Organgewinnung wurden geschlechtsreife Ratten (300 bis 400 g) verwendet. Die Extraktion der Testes (1.3 bis 1.7 g) erfolgte einzeln in 10 ml 0.1 N HCl (siehe 4.2.1.). Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen HCl-Extrakte von Rattenhoden ohne Vorreinigung (siehe 4.2.) über Sephadex G-50 (siehe 4.9.) fraktioniert wurden. Die Extrakte wurden lyophilisiert, der Trocknungsrückstand in 0.1 M Essigsäure wiederaufgenommen und zentrifugiert (8000 x g, Biofuge A). Der klare Überstand wurde gelchromatographiert (Sephadex G-50). Dabei konnte zum Teil Immunreaktion detektiert werden, die unregelmäßig zwischen den Fraktionen des Ausschluß- und Totalvolumens verteilt war. Bei dieser Immunreaktion kann es sich um eine Störung der Antigen-Antikörper-Reaktion im RIA durch die Unreinheit der Probe handeln, zumal sie nach erneuter Analyse (RP-HPLC) (siehe 4.10.) nicht mehr detektiert werden konnte.

Weitere HCl-Extrakte von Rattenhoden wurden zur Vorreinigung auf XAD-4-Säulen (siehe 4.3.2.) aufgetragen und anschließend über Sephadex G-50 analysiert. Die Trennung zeigte Immunreaktion (Antiserum "Loisl II"), deren

Retentionszeit mit sythetischem rat ANF(2-126) (Abb. 33) identisch war. Auch bei der RP-HPLC-Analyse (Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min) in den Sephadex-Fraktionen gemessenen Immunreaktion coeluierte der mit dem Antiserum "Loisl II" detektierte Peak mit synthetischem rat ANF(2-126) (Abb. 34). Nach identischen Analysentechniken wurde zur Detektion das Antiserum "GT-23" verwendet (Abb. 35). "GT-23" ist gegen die N-terminale Seite von ANF(1-126) gerichtet und zeigt daher 100 % Kreuzreaktivität mit ANF(1-126), ANF(99-126) ist es nicht in der Lage zu erkennen.

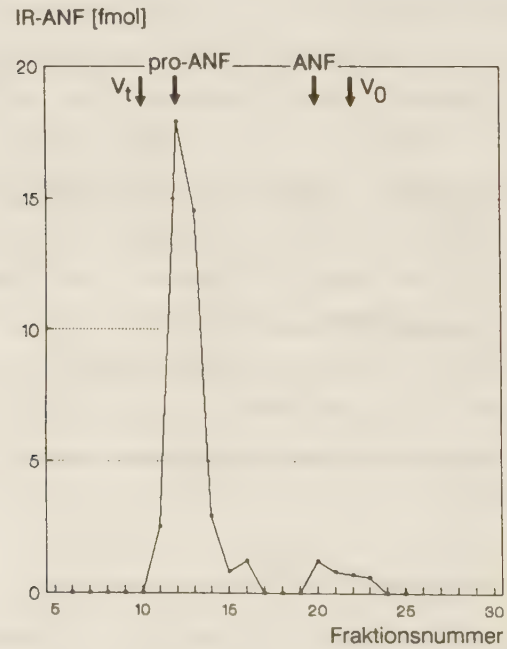


Abb. 33: Sephadex G-50: HCl-Extrakt eines Rattenhodens nach Vorreinigung über XAD-4. Detektion mit "Loisl II".

Wiederfindungsversuche (n = 4) (siehe 4.2.7.) mit synthetischem ANF(2-126) ergaben nach Vorreinigung (XAD-4) und Gelchromatographie (Sephadex G-50) allein 4 %. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum "Loisl II". Weitere Versuche (n = 3) ergaben mit dem Antiserum "GT-23" keine höhere Wiederfindungsrate an synthetischem rat ANF(2-126).

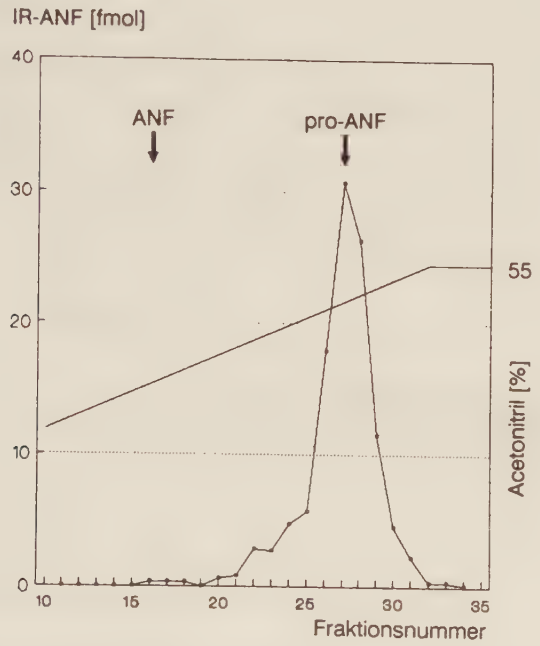


Abb. 34: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min): HCl-Extrakt eines Rattenhodens nach Vorreinigung (XAD-4) und Trennung über Sephadex G-50. Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum "Loisl II".

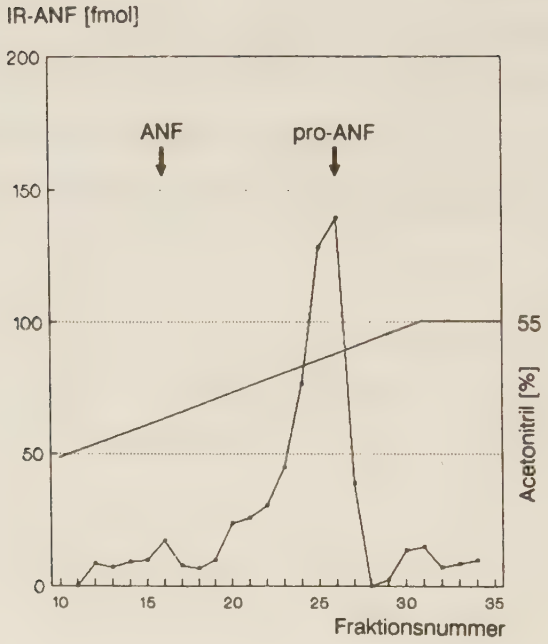


Abb. 35: RP-HPLC (Säule Ultrasphere ODS 2 mm x 150 mm, Acetonitril-Gradient 20 bis 55 % in 55 min): Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum "GT-23".

6. DISKUSSION

Der Nachweis Atrialer Natriuretischer Peptide in biologischem Material wurde bisher vorwiegend mittels immunhistochemischer Techniken geführt. Diese Methoden erlauben zwar einerseits zufriedenstellende Aussagen über die Organverteilung der Peptide und insbesondere deren Lokalisation auf zellulärer Ebene, andererseits können die endogenen ANF-Peptide bei der Immunhistochemie chemisch nicht näher charakterisiert und bestenfalls semiquantitativ erfaßt werden. Die vorliegende Arbeit widmet sich daher neben dem qualitativen Nachweis Atrialer Natriuretischer Peptide vor allem dem Problem der Quantifizierung dieser Peptide in biologischem Material.

Als Ergebnis der eigenen Untersuchungen ist zu vermerken, daß mittels der beschriebenen biochemisch-immunologischen Analytik ANF-Peptide zwar grundsätzlich aus verschiedenen Geweben isoliert, gereinigt und durch Vergleich mit synthetischen Eichsubstanzen qualitativ identifiziert werden konnten, daß aber eine befriedigende und allgemein verbindliche Methode zur quantitativen Bestimmung von ANF (99-126) bzw. ANF(1-126) nicht gefunden werden konnte.

Die Isolierung und Bestimmung körpereigener Peptide erfordert: 1. die Möglichkeit der Detektion dieser Substanzen und 2. deren adäquate Analytik.

Die zur Detektion Atrialer Natriuretischer Peptide selbst produzierten bzw. zur Verfügung gestellten Antiseren waren von hoher Spezifität und in ausreichender Quantität vorhanden. Die Fähigkeit der verwendeten Immunglobuline, sowohl C- (Antiseren "Loisl", "Toni" und "17/26") als auch N-terminale (Antiserum "GT-23") Sequenzen zu erkennen, gestattete eine sichere Identifizierung von endogenen ANF-Peptiden. Quantitative Bestimmungen von synthetischem rat ANF(2-126) bzw. endogenem ANF(1-126) erwiesen sich jedoch als problematisch, wenn diese nach der RIA-Methode 1 mit Antiseren gegen das C-Terminal von ANF(1-126), ^{125}I-rat ANF(99-126) als Tracer und rat ANF(99-126) als Standard gemessen wurden. Bei der Messung des Vorläuferpeptids nach dieser RIA-Technik müssen die Ergebnisse entsprechend der Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit dem Antigen korrigiert werden. Die Korrektur ist einfach, wenn man im Idealfall parallel verlaufende Bindungskurven von synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) mit den Antiseren erhält. Dies war jedoch nicht gegeben (siehe Abb. 2), so daß die Kreuzreaktivitäten willkürlich bei 50%iger Bindung angegeben wurden. Daraus resultierten, je nachdem wo die Meßpunkte auf der Bindungskurve lagen, zwangsläufig Fehler bei der Berechnung. Die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche von synthetischem ANF(2-126) können aus diesem Grund nur mit Vorbehalt beurteilt werden, zumal sie darüber hinaus in verschiedenen, nicht vergleichbaren RIA-Ansätzen ermittelt wurden. Sie sollen lediglich eine Tendenz wieder-

geben, weshalb auch auf große n-Zahlen und die Berechnung der Standardabweichung verzichtet wurde.

Die Analytik der ANF-Peptide extrakardialer Gewebe war mit Schwierigkeiten verbunden, während sie sich für das Herz als weniger problematisch erwies, wahrscheinlich weil das Organ besonders große Mengen der Peptide speichert und diese daher aus kleinen Gewebsmengen, z.B. einem einzigen Rattenatrium, im pikomolaren Bereich isoliert werden können.

Die Vorversuche zur Organextraktion und -vorreinigung in Abwesenheit von biologischem Material zeigten, daß sowohl synthetisches rat ANF(99-126) als auch synthetisches rat ANF(2-128) gegenüber 0.1 N HCl und Hitze stabil sind und nach der Extraktion zu einem hohen Prozentsatz wiederentdeckt werden können. Des weiteren erwiesen sich C_{18}-Cartridges mit einer Wiederfindungsrate von 70 % für die Anreicherung von rat ANF(99-126) als sehr geeignet. Bei der Vorreinigung von rat ANF(2-128) über C_{18}-Cartridges wurden, nach Korrektur der Kreuzreaktivitäten, ähnlich hohe Ausbeuten ermittelt.

In den Versuchen zur Extraktion, Vorreinigung und gelchromatographischen Trennung von Rattenatrien wurde unter den Bedingungen der HCl-Extraktion ausschließlich ANF (1-126) gemessen, während von anderen Untersuchern in Atriumextrakten auch niedermolekulare ANF-Peptide (Immunreaktion) nachgewiesen wurden (13). Da Atrien ausschließ-

lich ANF(1-126) speichern (14), könnte bei der Aufarbeitung der Gewebe eine Abspaltung von ANF(99-126) aus ANF-(1-126) erfolgt sein. Der zusätzliche Einsatz von Enzymhemmern bei der HCl-Extraktion erwies sich für das Ergebnis der HCl-Extraktion als überflüssig. Bei der Aufarbeitung von Rattenatrien in 0.1 N HCl, jedoch ohne Anwendung von Hitze, sowie bei einer Extraktion der Organe in Puffer nach dem Schema der HCl-Extraktion wurde dagegen ANF(99-126)-Immunreaktion nachgewiesen. Die Anwendung von Hitze und Säure ist somit für die Stabilität von ANF-Peptiden während der Extraktion essentiell.

Sephadex G-50- und HPLC-Säulen wurden mit synthetischem rat ANF(99-126) und rat ANF(2-126) geeicht. Die Reinsubstanzen konnten zu etwa 80 (Sephadex G-50) bzw. 90 % (RP-HPLC) wiederentdeckt werden. Bei der Analyse von Organextrakten mittels dieser Trennsysteme ist demgemäß nur mit geringen Verlusten an ANF-Peptiden zu rechnen. Die gelchromatographische Analyse ermöglichte eine vollständige Trennung von ANF(99-126) und ANF(1-126), so daß die Peptide in einem RIA-Ansatz erfaßt werden konnten. Nach der Vorreinigung der Organextrakte über C_{18}-Cartridges wurden diese über die Sephadex G-50-Säulen weiter gereinigt, denn nur die immunreagierenden Fraktionen wurden gepoolt, die restlichen Fraktionen verworfen. Mit den Fraktionen des Ausschlußvolumens wurden insbesondere Proteine eliminiert, die zu einer Störung der Antigen-Antikörper-Reaktion im RIA führen könnten. Die HPLC-Analyse der positiven Sephadex G-50-Fraktionen nach einem

anderen Trennprinzip (RP-Chromatographie) ermöglichte die Abtrennung weiterer IR-Komponenten des Extrakts. Sie erlaubte darüber hinaus, ebenso wie die Verwendung zweier oder mehrerer Antiseren zur Messung der Immunreaktion im RIA, eine doppelte Absicherung gegen die Detektion "falscher" Immunreaktionen, da die Elutionspositionen der isolierten ANF-Peptide sowohl nach der Gelchromatographie als auch nach der HPLC-Analyse mit den entsprechenden Eichsubstanzen verglichen werden konnten.

Die quantitative Bestimmung von ANF(1-126) in Extrakten von Rattenatrien wurde durch direkte Messung der verdünnten Extrakte im RIA durchgeführt. Diese Methode konnte nur bei Herzvorhofgewebe angewendet werden, da dieses Organ ANF(1-126) in besonders hoher Konzentration speichert, und durch die hohe Verdünnung der Extrakte eine unspezifische Störung der Antigen-Antikörper-Reaktion im RIA vermieden werden kann. Extrakte anderer Organe, die ANF-Peptide in weitaus geringerer Konzentration enthalten, müssen zur Quantifizierung von ANF-Peptiden über mehrere Schritte gereinigt werden. Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit in der Literatur angegebenen Werten für den ANF(1-126)-Gehalt von Rattenatrien zeigt die Schwierigkeiten bei der quantitativen Erfassung von ANF-Peptiden auf. Tang et al. (69) messen in Atrien von Ratten (200 bis 240 g) lediglich 30-35 pmol ANF-Immunreaktion/mg Protein und differenzieren nicht zwischen linken und rechten Atrien. Kazuya et al (70) geben 60 µg Immunreaktion/g Herzvorhofgewebe an. Dies

entspricht etwa 200 pmol human ANF(99-126)-Immunreaktion/Atrium. Cantin et al. (48) finden etwa 6500 pmol rat ANF(101-126)-Immunreaktion in beiden Atrien. Bei den eigenen Untersuchungen wurden in rechten Atrien 925 pmol ANF(1-126)/mg Protein, in linken Atrien 570 pmol gemessen (der Proteingehalt von rechten Rattenatrien beträgt ca. 1.8 mg, von linken Atrien ca. 1.6 mg).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der ANF-Peptide innerhalb des Wirbeltierreichs (63) war es möglich, mit den zur Verfügung stehenden Antiseren auch in Herzvorhofgeweben anderer Tierspezies ANF(1-126) zu identifizieren. Extrakte von Schweine- und Rinderatrien enthielten neben ANF(1-126) auch kleine Mengen ANF(99-126). Möglicherweise hat durch die lange Zeitdauer zwischen der Schlachtung der Tiere und dem Aufarbeiten des Materials eine Abspaltung von ANF(99-126) aus ANF(1-126) stattgefunden. Der Nachweis von ANF-Peptiden in HCl-Extrakten von Kükenatrien mit den Antiseren "Loisl II" und "Toni III" war dagegen negativ und die Reaktion mit "17/26" nur schwach positiv. Dies deutet, da bei immunhistochemischen Untersuchungen ANF-Immunreaktion in Herzen von Hühnern nachgewiesen wurde (63), auf eine sehr verschiedene Aminosäurensequenz der ANF-Peptide dieser Spezies hin. Andererseits sind aber am Kükenrektum Rezeptoren für rat ANF(99-126) vorhanden (30), weshalb aufgrund der hohen Spezifität der Ligand-Rezeptor-Bindung eine große Ähnlichkeit des Hühner-ANF mit Ratten-ANF(99-126) bestehen sollte.

Bei den Versuchen am isolierten Kükenrektum konnte die muskelrelaxierende Wirkung von synthetischem ANF(99-126) und aus Rattenatrien isoliertem ANF(1-126) gezeigt werden. Derartige biologische Versuche haben nur geringe Aussagekraft, und sind, solange die Spezifität dieser Wirkung nicht demonstriert wird, nur zur ergänzenden Beweisführung in Kombination mit biochemisch-analytischen Nachweismethoden sinnvoll. Der Nachweis einer spezifischen Wirkung könnte am überzeugendsten mittels eines ANF-Antagonisten geführt werden, der aber bisher nicht verfügbar ist. ANF-Peptide werden im biologischen Versuch nicht direkt, sondern nur über einen von ihnen induzierten Effekt gemessen. Dies ermöglicht, daß störende Begleitstoffe in den Organextrakten die Wirkung der ANF-Peptide hemmen, antagonisieren bzw. selbst muskelrelaxierende Aktivität zeigen. Es besteht ferner die Möglichkeit, daß durch zu drastische Behandlung bei der Extraktion ANF-Peptide einen Verlust an biologischer Aktivität erleiden. Dies kann durch Aufbrechen der Ringstruktur zwischen den Aminosäuren 105 und 121 (Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten) (4) oder durch Abspaltung C-terminaler Aminosäuren (71) geschehen.

Die am Beispiel von Rattenatrien erarbeiteten analytischen Techniken lieferten die Grundlage, um ANF-Peptide auch in anderen Organen nachweisen und identifizieren zu können.

Aus Lungenextrakten von Ratten und Meerschweinchen wurde ANF(1-126) isoliert. Dies bestätigt die Lunge (72) als Syntheseort Atrialer Natriuretischer Peptide. Immunreaktion in der Elutionsposition von ANF(99-126) wurde, im Gegensatz zu den Untersuchungen von Gutkowska et al. (40), nur in einem Teil der Extrakte gemessen. Es ist wahrscheinlich bei der Aufarbeitung des Gewebes aus ANF(1-126) abgespalten worden. Lungenextrakte von Ratten enthielten 62 pmol ANF(1-126)/g Gewebe. Gutkowska et al. (40) machen keine Angaben über die Quantität der aus Rattenlungen isolierten Immunreaktion, Sakamoto et al. (73) konnten nur geringe Mengen (2 pmol) ANF(99-126)-Immunreaktion in Lungenextrakten feststellen.

Des weiteren wurde in Gehirnextrakten von Ratten ANF (1-126) nachgewiesen, und damit jene Publikationen gestützt, die das ZNS als Syntheseort von ANF-Peptiden ausweisen (34,35). Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur (34,35) konnte jedoch nur eine niedermolekulare ANF-Form, ANF(103-126), nachgewiesen werden. Das von Ueda et al. (34) und Shiono et al. (35) neben ANF(103-126) isolierte ANF(102-126) konnte nicht detektiert werden, obwohl das Peptid ein intaktes C-Terminal aufweist, und deshalb von dem Antiserum "Toni III" erkannt werden müßte. ANF(102-126) stand als Reinsubstanz nicht zur Verfügung, möglicherweise wurde es bei der RP-Chromatographie gemeinsam mit ANF(103-126) eluiert.

In Extrakten der Glandd. mandibulares und des Pankreas von Meerscheinchen wurde ANF(99-126), das im Blut zirkulierende ANF-Peptid, detektiert. Über die Lokalisation Atrialer Natriuretischer Peptide in Speicheldrüsen, deren genaue Aminosäurensequenz unbekannt ist, liegt bisher nur eine immunhistochemische Untersuchung vor (38). ANF-Peptide konnten hierbei in den Drüsenzellen der Glandd. parotis, sublingualis und mandibularis von Ratten nachgewiesen werden. Immunhistochemisch identifizierte ANF-Peptide in Pankreasgewebe von Ratten wurde auch von Lindop et al. (41) beschrieben. Sie lokalisierten ANF-Peptide in den glucagonproduzierenden Zellen des Pankreas, konnten jedoch die Immunreaktion keinem bestimmten ANF-Peptid zuordnen. Die in Speicheldrüsen und Pankreas gemessene ANF(99-126)-Immunreaktion könnte während der Aufarbeitung des Materials proteolytisch aus ANF(1-126), der Speicherform für ANF-Peptide, abgespalten worden sein. Andererseits ist denkbar, daß diese Gewebe tatsächlich ANF(99-126) enthalten und dieses eine intrazelluläre Speicherform darstellt. Diskutiert wird ebenfalls eine Internalisation von im Blutkreislauf zirkulierendem ANF(99-126) nach Anlagerung an ANF-Rezeptoren (74).

In HCl-Extrakten von Darmgewebe (Jejunum, Caecum und Colon) des Meerschweinchens sowie in der Milz von Meerschweinchen und im Hodengewebe von Ratten, wurde mittels Gelchromatographie und HPLC der ANF-Vorläufer ANF(1-126) identifiziert. Einige Extrakte von Colon, Jejunum und

Milz enthielten neben ANF(1-126) auch Immunreaktion, die bei Gelchromatographie und HP-GFC im Molekulargewicht zwischen ANF(1-126) und ANF(99-126) lag und auch bei einer RP-Auftrennung mittels HPLC zwischen ANF(99-126) und seinem Vorläufer auftrat. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein Degradationsprodukt von ANF(1-126), das während der Extraktion oder Reinigung der Gewebe entstanden ist. Eine genaue Identifizierung des Materials konnte nicht stattfinden. Möglicherweise entspricht die Substanz einem von Gutkowska et al. (40) in Lungenextrakten von Ratten detektierten ANF-Peptid, das ebenfalls bei der RP-Analyse zwischen ANF(99-126) und ANF(1-126) eluierte.

In der Literatur finden sich keine Hinweise auf die Probleme, die bei der biochemisch-immunologischen Analytik Atrialer Natriuretischer Peptide auftreten. Trotzdem bereitet die Untersuchung extrakardialer Gewebe offensichtlich erhebliche Schwierigkeiten, da der Nachweis von ANF-Peptiden in diesen Organen hauptsächlich mittels immunhistochemischer Techniken (38,39,40) geführt worden ist, bzw. über die Isolierung und Identifizierung der Peptide hinaus keine Angaben über deren Quantität publiziert wurden (34,35,40).

Die Konzentrationen der in extrakardialen Geweben, nach HCl-Extraktion, Vorreinigung über C_{18}-Cartridges und Trennung über Sephadex G-50 bzw. HPLC gemessenen ANF-Peptide, variierten erheblich. Die Wiederfindungsraten

von synthetischem rat ANF(2-126) aus Homogenaten von Colon, Milz und Hoden, die in 0.1 N HCl extrahiert, über C_{18}-Cartridges vorgereinigt und gelchromatographisch (Sephadex G-50) analysiert wurden, lagen im Bereich von 10 %.

Um quantitative Bestimmungen durchführen zu können, mußte die Ursache für die erhebliche Streubreite der insbesondere in den Organeextrakten von Darm, Milz und Testes gemessenen Peptidkonzentrationen geklärt werden. Es mußte ausgeschlossen werden, daß ANF-Peptide bei der Organextraktion durch unvollständigen Zellaufschluß im Pellet retiniert werden. Der Nachweis, ob bei der HCl-Extraktion extrakardialer Gewebe alle ANF-Peptide aus den Zellen freigesetzt werden, ist schwierig zu führen. Der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in körpereigene Peptide könnte einen Hinweis auf die Effizienz der Extraktion geben, indem nach der Extraktion der Gewebe gemessen wird, ob Radioaktivität zurückbleibt. Dies stand jedoch im Rahmen dieser Arbeit außerhalb der Möglichkeiten. Versuche, Colongewebe bei der HCl-Extraktion möglichst vollständig aufzuschließen wurden mit Ultraschall durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Zellen durch mehrmaliges Gefrieren und Wiederauftauen der Homogenate lysiert. Dies führte ebensowenig zu besser reproduzierbaren Ausbeuten an endogenem ANF(1-126), wie die Anwendung anderer Techniken zur Peptidextraktion (Essigsäure-, HCl-Aceton- und Heptan-HCl-Extraktion). Folglich kann eine unvollständige Peptidextraktion als Ursache für

die variablen ANF(1-126)-Konzentrationen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Des weiteren mußte als Ursache für die variablen Ausbeuten an endogenem ANF-Peptiden und die niedrigen Wiederfindungsraten von synthetischen rat ANF(2-126) in Betracht gezogen werden, daß ANF-Peptide aufgrund ihrer Ladungsverteilung dazu neigen, unspezifisch an Oberflächen zu adsorbieren. Dies ist z. B. von basischen Peptiden, wie dem Opioidpeptid Dynorphin, bekannt (75,76). Um eine unspezifische Adsorption der ANF-Peptide an Oberflächen oder die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ausschließen zu können, wurden HCl-Extraktionen von Colongewebe in Gegenwart von 2 M NaCl, 6 M Harnstoff, 2 % Triton X-100 bzw. 1 % SDS durchgeführt. Da die Wiederfindungsraten von synthetischem ANF(2-126) aus den Colonhomogenaten hierdurch nicht verbessert wurden, konnte auch eine besondere Affinität von ANF(1-126) bzw. ANF(2-126) als Grund für die schwankenden Ausbeuten an endogenem ANF(1-126) nicht verantwortlich gemacht werden.

Das Experiment zur Inkubation von ANF(1-126) (aus gereinigten Colonextrakten) mit nur 5 µl Organüberstand (3 g Colon/ml Puffer) zeigte, wie außerordentlich hoch die proteolytische Aktivität in Darmhomogenaten ist. Dennoch ist nicht zu erwarten, daß unter den Extraktionsbedingungen (pH 1, <90°C) eine derartige proteolytische Spaltung auftritt. Um sich gegen eine proteolytische Degradation des ANF(1-126) während der Aufarbeitung ab-

zusichern, wurden Colonabschnitte vor der Extraktion für 3 h in Bouinscher Lösung fixiert. Des weiteren wurde Colongewebe in Gegenwart von Enzymhemmern gewaschen, präpariert und extrahiert. Die unter diesen Versuchsbedingungen gemessenen Quantitäten an ANF(1-126) variierten dennoch erheblich. Aus der Literatur gibt es Hinweise, daß ANF(99-126) vornehmlich an den C-terminalen Aminosäuren Phenylalanin-Arginin-Tyrosin leicht proteolytisch degradiert wird (77). Da die am häufigsten zur Detektion verwendeten Antikörper "Loisl II" und "Toni III" beide Strukturen am C-Terminal erkennen, wäre ihre Kreuzreaktivität mit einem derartig veränderten ANF(1-126) bzw. ANF(99-126) stark vermindert, so daß in geringen Konzentrationen vorliegende ANF-Peptide nicht mehr detektiert werden könnten. Demgemäß sollten die Wiederfindungsraten von synthetischem rat ANF(2-126) bedeutend höher ausfallen, wenn zur Detektion das an der N-terminalen Seite angreifende Antiserum "GT-23" verwendet wird. Dies konnte jedoch in Versuchen zur Wiederfindung von synthetischem rat ANF(2-126) aus Hodenextrakten nicht bestätigt werden. Es kann daher vermutet werden, daß das endogene ANF(1-126) wie das zugesetzte synthetische ANF(2-126) in einem anderen Versuchsabschnitt verloren geht.

Versuche zur Wiederfindung von synthetischem rat ANF(2-126) bei der Vorreinigung von Colonextrakten [endogenes ANF(1-126) war zuvor durch Inkubation des Homogenats in puffer degradiert worden], das zusammen mit den Extrakten

über C_{18}-Cartridges gegeben wurde, ergaben große Streuungen in den Wiederfindungsraten des synthetischen Peptids. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu den Resultaten der Vorversuche, in denen die Cartridges allein mit synthetischem rat ANF(2-126) beschickt wurden. Versuche mit ^{125}I-ANF(99-126) zeigten, daß beim Beschicken von C_{18}-Cartridges in Gegenwart von Organextrakten ein beträchtlicher Anteil der Radioaktivität durchgedrückt wird, während dies beim Auftragen von ^{125}I-ANF in 0.1 N HCl nicht geschieht. Diese Unzulänglichkeit der C_{18}-Cartridges kann für die unterschiedlich hohen Ausbeuten bei der Extraktion von endogenem ANF(1-126) verantwortlich sein, zumal andere Versuche gezeigt hatten, daß auf den Vorreinigungsschritt bei Organen mit geringem ANF(1-126)-Gehalt nicht verzichtet werden kann. Ein Vergleich mit anderen Techniken ergab zwar, daß das Adsorberharz XAD-4, vor allem aufgrund der geringeren Streubreite der Meßwerte, zur Anreicherung von ANF(2-126) besser geeignet ist als C_{18}-Cartridges und der Kationenaustauscher SP Sephadex C-25. Insgesamt jedoch müssen bei jeder der getesteten Methoden sehr hohe Verluste an ANF-Peptiden in Kauf genommem werden.

Schließlich kommt als weiterer Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit der ANF(99-126)- bzw. ANF(1-126)-Konzentrationen in extrakardialen Gewebe eine unspezifische Störung der Antigen-Antikörper-Reaktion im RIA in Frage. Dies würde bedeuten, daß die Peptide möglicherweise quantitativ extrahiert und mit nur geringen Verlusten

gereinigt werden konnten, daß aber Störsubstanzen aus den Organextrakten mit in den RIA-Ansatz gelangten, die die Detektion der ANF-Peptide beeinträchtigten. Diesem Problem könnte man durch weitere analytische Techniken, z.B. Affinitätschromatographie, begegnet werden. Andererseits ist bekannt, daß jeder zusätzliche analytische Schritt mit einem Verlust der zu quantifizierenden Substanz verbunden ist.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung Atrialer Natriuretischer Peptide in extrakardialen Geweben wurden bisher vorwiegend immunhistochemische Techniken angewendet, obwohl diese keine nähere Charakterisierung oder Quantifizierung der Peptide zulassen. In der vorliegenden Arbeit sollte das Problem des qualitativen und quantitativen Nachweises von ANF-Peptiden in biologischem Material näher studiert werden.

Rattenatrien, die große Mengen ANF(1-126) enthalten, wurden herangezogen, um eine analytische Methode für ANF-Peptide zu erarbeiten. Die Extraktion der Rattenatrien wurde standardisiert, und Aliquots der aufgereinigten Proben wurden im RIA mit spezifisch gegen ANF-Peptide gerichtete Antiseren detektiert. Das immunreagierende Material wurde gepoolt und mittels HPLC weiterhin analysiert. In den derartig vorbereiteten Proben konnte ANF(1-126), der Vorläufer des im Blut zirkulierenden ANF(99-126), identifiziert werden.

Mittels der genannten analytischen Techniken konnten ANF-Peptide auch aus anderen Organen isoliert und immunologisch identifiziert werden. In Lungen-, Gehirn- und Hodengewebe von Ratten wurde die Speicherform ANF(1-126) nachgewiesen. In Gehirnextrakten konnte neben ANF(1-126) ein niedermolekulares Peptid, ANF(103-126), identifiziert werden. Im Pankreas und in Speicheldrüsen von Meerschweinchen wurde ANF(99-126) nachgewiesen. Im Dünn- und

Dickdarm sowie in der Milz von Meerschweinchen wurde ANF(1-126) identifiziert. Außerdem konnte Immunreaktion detektiert werden, die bei Trennung nach Molekulargewicht und nach Polarität zwischen ANF(99-126) und ANF(1-126) eluierte. Das Material konnte nicht näher identifiziert werden.

Grundsätzlich bereitete die quantitative Erfassung von ANF-Peptiden erhebliche Schwierigkeiten. Insbesondere die in Darm-, Milz- und Hodenextrakten gemessenen Konzentrationen an ANF(1-126) variierten erheblich. In Versuchen zur Wiederfindung von synthetischem rat ANF(2-126) aus Colon-, Milz- und Hodenhomogenaten konnten nach der Standardextraktion nur etwa 10 % der eingesetzten Peptidmenge wiedergefunden werden. Als Ursache für diese Ergebnisse wurde ein unvollständiger Zellaufschluß bei der Extraktion, eine proteolytische Spaltung der Peptide, und/oder eine unspezifische Adsorption der extrahierten Peptide an Oberflächen vermutet. Detaillierte Versuche konnten derartige Ursachen aber weitgehend ausschließen. Es wurde jedoch gezeigt, daß bei der Vorreinigung von Organextrakten über C_{18}-Cartridges erhebliche Peptidverluste eintreten, so daß diese für die schlecht reproduzierbaren ANF(99-126)- bzw. ANF(1-126)-Konzentrationen verantwortlich gemacht wurden. Da auch bei anderen Methoden zur Vorreinigung von Organextrakten hohe Peptidverluste in Kauf genommen werden müssen und auf einen Vorreinigungsschritt nicht verzichtet werden kann, läßt sich derzeitig eine zuverlässige Methode zur quanti-

tativen Bestimmung von ANF-Peptiden in biologischem Material nicht mitteilen.

8. SUMMARY

ANALYSIS OF ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDES

Previous investigations of atrial natriuretic peptides in extracardial tissues relied upon immunohistochemical techniques, therefore, characterization or quantification of the peptides were not possible. The present work addresses the problem of qualitative and quantitative determination of atrial natriuretic peptides in biological materials.

Rat atria, which contain large amounts ANF(1-126), were used to analyse atrial natriuretic peptides. Standard acidic extraction procedures for these peptides were developed. Aliquots of the purified samples were detected using radioimmunoassy by means of specific antisera. The immunoreactive fractions were pooled and applied to HPLC. In these samples the precursor ANF(1-126) could be identified.

Using these analytical methods atrial natriuretic peptides could be isolated and identified in other organs. In rat lung, brain and testes the storage form, ANF(1-126), could be found. In brain extracts ANF(1-126) and a low molecular weight peptide, coeluting with ANF(103-

126), were identified. Guinea pig pancreas and salivary glands contained ANF(99-126) the circulatory form of atrial natriuretic peptides. In guinea pig intestine (small and large) and spleen ANF(1-126) immunoreactivity was identified. In addition, immunoreactive material was obtained after chromatography on Sephadex G-50, HP-GPC and RP-HPLC, which eluted between ANF(1-126) and ANF(99-126).

Reliable quantification of atrial natriuretic peptides proved to be difficult. Variable concentrations of ANF(1-126) were measured from gut, spleen and testes extracts. It would, therefore, appear that the preextraction of organ extracts with C_{18} cartridges results in a large loss of peptide explaining the poor reproductibility of the extraction. With other preextraction methods peptide recovery could not be improved, however, this step could not be omitted. Presently it is not possible to present more reliable methods to quantify atrial natriuretic peptides in biological materials.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1 Kisch B: Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. Exp Med Surg 14 (1956) 99

2 Cantin M, Genest J: The heart and the atrial natriuretic factor. Endocr Rev 6 (1985) 107

3 Jamieson JD, Palade GE: Specific granules in the atrial muscle cell. J Cell Biol 23 (1964) 151

4 Cantin M, Genest J: Das Herz als endokrine Drüse. Spektrum der Wissenschaft 4 (1986) 122

5 Huet M, Cantin M: Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. II. Characterization of the protein content of specific granules. Lab Invest 30 (1974) 525

6 Huet M, Benchimol S, Berlinguet JC, Castonguay Y, Cantin M: Cytochimie ultrastructurale des cardiocytes de l'oreillette humaine. IV. Digestion des granules spécifiques par les protéases. J Microsc 21 (1974) 147

7 Yunge L, Benchimol S, Cantin M: Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. VII. Radioautographic study of synthesis and migration of glycoproteins. J Mol Cell Cardiol 11 (1979) 375

8 Mairie JP, Guillemot H, Hatt PY: Le degré de granulation des cardiocytes auriculaires. Étude planimétrique au cours de différents apports d'eau et de sodium chez le rat. Pathol Biol (Paris) 24 (1976) 549

9 Flynn TG., PL Davies: The biochemistry and molecular biology of atrial natriuretic factor. Biochem J 232 (1985) 313

10 De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci 28 (1981) 89

11 Lang RE: Atriales Natriuretisches Peptid. Ein kardiales Hormon. Münch Med Wschr 127 (1985) 1105

12 Lewicki JA, Greenberg B, Yamanaka M, Vlasuk G, Brewer M, Gardner D, Baxter J, Johnson LK, Fiddes JC: Cloning, sequence analysis, and processing of the rat and human atrial natriuretic peptide precursors. Fed Proc 45 (1986) 2086

13 Trippodo NC, Januszewicz A, Cole FE, MacPhee AA, Pegram BL, Kardon MB: Conversion factors of high- to low-molecular-weight forms of atrial natriuretic factor. Fed Proc 45 (1986) 2091

14 Thibault G, Seidah NG, Cromlish JA, Garcia R, Gutkowska J, Chrétien M, Genest J, Cantin M: Intracellular storage form of atrial natriuretic factor. J Hypertension 4 (Suppl 6) (1986) 535

15 Gutkowska J, Horky K, Thibault G, Januszewicz P, Cantin M, Genest J: Atrial natriuretic factor is a circulating hormone. Biochem Biophys Res Comm 125 (1984) 315

16 Thibault G, Murthy KK, Gutkowska J, Seidah NG, Lazure C, Chrétien M, Cantin M: NH_2-terminal fragment of rat pro-atrial natriuretic factor in the circulation: Identification, radioimmunoassay and half-life. Peptides 9 (1988) 47

17 Imada T, Takayanagi R, Inagami T: Identification of a peptidase which processes atrial natriuretic factor precursor to its active form with 28 amino acid residues in particulate fractions of rat atrial homogenate. Biochem Biophys Res Comm 143 (1987) 587

18 Ruskoaho H, Lang RE, Toth M, Ganten D, Unger T: Release and regulation of atrial natriuretic peptide (ANP). European Heart J 8 (Suppl B) (1987) 99

19 Henry JP, Gauer OH, Reeves JL: Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. Circulat Res 4 (1956) 85

20 Dietz JR: Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension. Am J Physiol 247 (1984) 1093

21 Lang RE, Thölken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger Th: Atrial natriuretic factor-a circulating hormone stimulated by volume loading. Nature 314 (1985) 264

22 Petterson A, Hedner J, Ricksten S-E, Towle AC, Hedner T: Acute volume expansion as a physiological stimulus for the release of atrial natriuretic peptides in the rat. Life Sci 38 (1986) 1127

23 Katsube N, Schwartz D, Needleman P: Release of atriopeptin in the rat by vasoconstrictors or water immersion correlates with changes in right atrial pressure. Biochem Biophys Res Comm 133 (1985) 937

24 Manning PT, Schwartz D, Katsube NC, Holmberg SW, Needleman P: Vasopressin-stimulated release of atriopeptin: Endocrine antagonists in fluid homeostasis. Science 229 (1985) 395

25 Baranowska B., Gutkowska J, Cantin M, Genest J: Effects of α_1 and α_2 adrenergic agonists on plasma immunoreactive atrial natriuretic factor (IR-ANF) in conscious rats. Neuroendocrinol Lett 9 (1987) 261

26 Vollmar AM, Arendt RM, Schulz R: The effects of opioids on rat plasma atrial natriuretic peptide. Eur J Pharmacol 143 (1987) 315

27 Vandlen RL, Arcuri KE, Hupe L, Keegan ME, Napier MA: Molecular characteristics of receptors for atrial natriuretic factor. Fed Proc 45 (1986) 2366

28 Quirion R: Atrial natriuretic factors in the brain: An update. TINS 11 (1988) 58

29 Leckie B: Atrial natriuretic peptide. How the heart rules the kidney. Nature 326 (1987) 644

30 Currie MG, Geller DM, Cole BR, Boylan JG, YuSheng W, Holmberg SW, Needleman P: Bioactive Cardiac Substances: Potent vasorelaxant activity in mammalian atria. Science 221 (1983) 71

31 Chartier L, Schiffrin E, Thibault G: Effect of atrial natriuretic factor (ANF)-related peptides on aldosteron secretion by adrenal glomerulosa cells: Critical role of the intramolecular disulphide bond. Biochem Biophys Res Comm 122 (1984) 171

32 Samson WK, Aguila MC, Martinovic J, Antunes-Rodrigues J, Norris M: Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. Peptides 8 (1987) 449

33 Standaert DG, Cechetto DF, Needleman P, Saper CB: Inhibition of the firing of vasopressin neurons by atriopeptin. Nature 329 (1987) 151

34 Ueda S, Sudoh T, Fukuda K, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H: Identification of alpha atrial natriuretic peptide (4-28) and (5-28) in porcine brain. Biochem Biophys Res Comm 149 (1987) 1055

35 Shiono S, Nakao K, Morii N, Yamada T, Itoh H, Sakamoto M, Sugawara A, Saito Y, Katsuura G, Imura H: Nature of atrial natriuretic polypeptide in rat brain. Biochem Biophys Res Comm 135 (1986) 728

36 Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault G, Gutkowska J, Cantin M, Genest J: Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. Biochem Biophys Res Comm 123 (1984) 515

37 Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA: Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. Science 238 (1987) 675

38 Cantin M, Gutkowska J, Thibault G, Milne RW, Ledoux S, MinLi S, Chapeau C, Garcia R, Hamet P, Genest J: Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the heart and salivary glands. Histochemistry 80 (1984) 113

39 McKenzie JC, Tanaka I, Misono KS, Inagami T: Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the kidney, adrenal medulla, pituitary and atrium of rat. J Histochem Cytochem 33 (1985) 828

40 Gutkowska J, Cantin M, Genest J, Sirois P: Release of immunoreactive atrial natriuretic factor from the isolated perfused rat lung. FEBS Letters 214 (1987) 17

41 Lindop GBM, Mallon EA, MacIntyre G: Atrial natriuretic peptide in the heart and pancreas. Histol Histopath 1 (1986) 147

42 Hughes J: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. Brain Res 88 (1975) 295

43 Terenius L, Wahlström A: Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. Acta physiol scand 94 (1975) 74

44 Smith TW, Hughes J, Kosterlitz HW, Sosa RP: Enkephalins: Isolation , distribution and function. In: Opiates and endogenous opioid peptides. Ed: Kosterlitz HW. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1976)

45 Atlas SA, Kleinert HD, Camargo MJ, Januszewicz A, Sealey JE, Laragh JH, Schilling JW, Lewicki JA, Johnson LK, Maack T: Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. Nature 309 (1984) 717

46 Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP, Eubanks SR, Galluppi GR, Needleman P: Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). Science 223 (1984) 67

47 Toshimori H, Toshimori K, Oura C, Matsuo H, Matsukura S: The distribution of atrial polypeptide (ANP)-containing cells in the adult rat heart. Anat Embryol 177 (1988) 477

48 Cantin M, Garcia R, Thibault G, Kuchel O, Gutkowska J, Larochelle P, Hamet P, Schiffrin EL, Genest J: Atrial natriuretic factor (ANF) in experimental and human hypertension. Clin Invest Med 10 (1987) 561

49 Dzau VJ, Baxter JD, Cantin M, de Bold A, Ganten D, Gross K, Husain A, Inagami T, Menard J, Poole S, Robertson JIS, Tang J, Yamamoto K: Nomenclature for atrial peptides. New Engl J Med 316 (1987) 1278

50 Yamashita Y, Pedersen JH, Stadil F: Extraction of neurotensin-like immunoreactivities from porcine ileal mucosa. Peptides 8 (1987) 639

51 Scott AP, Lowry PJ: Adrenocorticotrophic and melanocyte-stimulating peptides in the human pituitary. Biochem J 139 (1974) 593

52 Seizinger BR, Liebisch DC, Gramsch C, Herz A, Weber E, Evans CJ, Esch FS, Böhlen P: Isolation and structure of novel C-terminally amidated opioid peptide, amidorphin, from bovine adrenal medulla. Nature 313 (1985) 57

53 Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H: Structural identification of β- and γ-human atrial natriuretic polypeptides. Nature 313 (1985) 397

54 Höllt V, Przewlocki R, Herz A: Radioimmunoassay of β-endorphin. Basal and stimulated levels in extracted rat plasma. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 303 (1978) 171

55 Arendt RM, Stangl E, Zähriger J, Liebisch DC, Herz A: Demonstration and characterisation of α-human atrial natriuretic factor in human plasma. FEBS Letters 189 (1985) 57

56 Sundsfjord JA, Thibault G, Larochelle P, Cantin M: Identification and plasma concentrations of the N-terminal fragment of proatrial natriuretic factor in man. J Clin Endocrinol Metab 66 (1988) 605

57 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72 (1976) 248

58 Williams BL, Wilson K: Ausschlußchromatographie (Molekularsieb-Chromatographie). In: Methoden der Biochemie. 2., bearb u verb Aufl, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1984)

59 Einführung in die Grundlagen der HPLC. Liquid chromatography course. Manual KBL Nr 41 (1984), Fa Beckman, München

60 Gibson TR, Shields PP, Glembotski CC: The conversion of atrial natriuretic peptide (ANP)-(1-126) to ANP-(99-126) by rat serum: Contribution ANP cleavage in isolated perfused rat hearts. Endocrinology 120 (1987) 764

61 Tanaka I, Misono KS, Inagami T: Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: Determination by specific radioimmunoassay. Biochem Biophys Res Comm 124 (1984) 663

62 Gutkowska J, Thibault G, Milne RW, Januszewicz P, Schiller PW, Cantin M, Genest J: Radioimmunoassay of atrial natriuretic factor (ANF) in rat atria. Proc Soc Exp Med Surg 176 (1984) 105

63 Chapeau C, Gutkowska J, Schiller PW, Milne RW, Thibault G, Garcia R, Genest J, Cantin M: Localization of immunoreactive synthetic atrial natriuretic factor (ANF) in the heart of various animal species. J Histochem Cytochem 33 (1985) 541

64 Forssmann WG, Birr C, Carlquist M, Christmann M, Finke R, Henschen A, Hock D, Kirchheim H, Kreye V, Lottspeich F, Metz J, Mutt V, Reineke M: The auricular myocardiocytes of the heart constitute an endocrine organ. Characterization of a porcine cardiac peptide hormone, cardiodilatin-126. Cell Tissue Res 238 (1984) 425

65 Ong H, McNicoll N, Lazure C, Seidah N, Chrétien M, Cantin M, De Léan A: Purification and sequence determination of bovine atrial natriuretic factor. Life Sci 38 (1986) 1309

66 Bourne JA: In: Handbook of immunoperoxidase staining methods. Dako Corporation (1983)

67 Vollmar AM, Schulz R: Evidence for the presence of ANP-precursor material in the rat thymus. Bichem Biophys Res Comm 155 (1988) 700

68 Mukhopadhyay AK, Schumacher M, Leidenberger FA: Steroidogenic effect of atrial natriuretic factor in isolated mouse Leydig cells is mediated by cyclic GMP. Biochem J 239 (1986) 463

69 Tang J, Xie CW, Xie XZ, Gao XM, Chang JK: Dynorphin A-(1-10) amide stimulates the release of atrial natriuretic polypeptide (ANP) from rat atrium. Europ J Pharmacol 136 (1987) 449

70 Kazuya O, Henry MA, Tangte J, Woodcock EA, Johnston CI: Atrial natriuretic peptide in dehydrated Long-Evans rats and Brattleboro rats. Kidney International 31 (1987) 760

71 Watanabe TX, Noda Y, Chino N, Nishiuchi Y, Kimura T, Sakakibara S, Imai M: Structure-activity relationships of α-human atrial natriuretic peptide. Europ J Pharmacol 147 (1988) 49

72 Gardner DG, Deschepper CF, Ganong WF, Satoshi H, Fiddes J, Baxter JD, Lewicki J: Extra-atrial expression of the gene for atrial natriuretic factor. Proc Natl Acad Sci 83 (1986) 6697

73 Sakamoto M, Nakao K, Morii N, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Saito Y, Imura H: The lung as a possible target organ for atrial natriuretic polypeptide secreted from the heart. Biochem Biophys Res Comm 135 (1986) 515

74 Morel G, Chabot J-G, Garcia-Caballero T, Gossard F, Dihl F, Belles-Isles M, Heisler S: Synthesis, internalization, and localization of atrial natriuretic peptide in rat adreneal medulla. Endocrinology 123 (1988) 149

75 Goldstein A, Fischli W, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L: Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. Proc Natl Acad Sci USA 78 (1981) 7219

76 Fischli W, Goldstein A, Hunkapiller MW, Hood LE: Isolation and amino acid sequence of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. Proc Natl Acad Sci USA 79 (1982) 5435

77 Deschodt-Lanckman M, Vanneste Y, Michaux F: Degradation of human atrial natriuretic peptide by human brain membranes. Neurochem Int 12 (1988) 367

Ich danke Herrn Prof. R. Schulz für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Vollmar für die fachliche Betreuung und die großartige menschliche Unterstützung.

Bei Frau G. Hach, Frau D. Misera und Frau U. Rüberg bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme im Labor und die Hilfe bei der Anfertigung von zahlreichen RIAs und Extrakten.

Ferner danke ich Herrn Dr. R. M. Arendt, München, für die Überlassung des Antiserums "Toni", Herrn M. Cantin, M. D., Ph. D., Montreal, für das Antiserum "GT-23" und Frau J. Gutkowska, Ph. D., Montreal, für das Antiserum "17/26".

Den Herren Dres. Schöne, Preibisch und Seipke, Hoechst AG, Frankfurt, danke ich für das synthetische rat ANF(2-126), Herrn Dr. R. E. Lang, Heidelberg, für die ANF-Peptide rat ANF(103-123) und rat ANF(101-126).

Lebenslauf

Am 11. Februar 1961 wurde ich als einziges Kind des Maschinensetzers Richard Friedrich und seiner Ehefrau Erna, geb. Grimm, in München geboren.

Von 1967 bis 1971 besuchte ich in München die Volksschule, danach bis 1975 das Louise-Schröder-Gymnasium. Im Herbst 1975 wechselte ich an das Viscardi-Gymnasium in Fürstenfeldbruck über, wo ich 1980 die Abiturprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1980 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Chemie, ehe ich 1981 das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität aufnahm. Am 5. Februar 1987 schloß ich dieses Studium mit dem Tierärztlichen Staatsexamen ab und erhielt am 19. Februar die Approbation als Tierärztin. Im März 1987 begann ich mit den praktischen Arbeiten zu meiner Dissertation am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.